

# D-异抗坏血酸钠前体产生菌 E54 发酵条件的优化

何建明 尹光琳

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

**摘要** 产酮产碱菌 E54 可利用 D-葡萄糖发酵产生 2-酮基-D-葡萄糖酸钙,再经甲酯化和化学转化而得到 D-异抗坏血酸钠。通过大量摇瓶和罐上试验,进一步优化了培养基组分,改进了发酵条件,并采用批加工工艺提高了投糖浓度。菌株在 5L 罐中发酵周期 36h 左右,利用 D-葡萄糖浓度 18~25g/100ml,克分子转化率达 90% 左右;在 147L 罐中发酵周期 40h 左右,利用 D-葡萄糖浓度 18~25g/100ml,克分子转化率达 90% 左右。

**关键词** 产酮产碱菌, D-葡萄糖, 发酵, 2-酮基-D-葡萄糖酸钙, 批加

D-异抗坏血酸钠(Sodium D-isoascorbate)的还原性很强,并具有反应速度缓慢、变化较小和对热较稳定等特点,因而作为食品抗氧化剂被广泛应用于食品工业;此外,还用作卷烟的添加剂,以降低致癌物质亚硝胺;用于干处理羊毛,可增加耐光度;是金属除锈剂和辐射药品的诊断剂;能治疗鱼类的病毒病;可用于延长采摘花卉的寿命;另外还具有一定的医疗效果。其生产方法简便,生产成本较  $V_C$  低,因此对 D-异抗坏血酸钠的需求量正在和  $V_C$  相竞争。

目前 D-异抗坏血酸钠的生产多用间接发酵法,即以微生物发酵经 D-葡萄糖生成 D-异抗坏血酸钠的直接前体——2-酮基-D-葡萄糖酸钙(下称 Ca-2-KDG),再经甲酯化<sup>[1]</sup>和化学转化<sup>[2]</sup>即得到 D-异抗坏血酸钠。有关此工艺的研究国内外已有过很多报道<sup>[3~5]</sup>;尹光琳等在北京微生物研究所筛选得到产酮产碱菌 E54 和恶臭假单胞菌 E301,并进行了相关的探索<sup>[6,7]</sup>。本文选用产酮产碱菌 E54,旨在原小试研究基础上<sup>[8]</sup>,通过提高底物浓度和改进发酵条件的研究,包括培养基的简化、批加工工艺和发酵条件控制的摸索,提高发酵水平,以使整个工艺更适宜于工业化生产,并在此基础上进行了 147L 罐的扩大试验。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

产酮产碱菌 E54;研究过程中已进行了诱变处理。

### 1.2 培养基

斜面及茄瓶培养基:常规 LB 配方。

种子培养基(%):D-葡萄糖 2, NaCl 0.2,  $\text{CaCO}_3$  0.4, 玉米浆 2。

发酵培养基(%):D-葡萄糖(分消)20, 玉米浆 2, 尿素 0.1,  $\text{CaCO}_3$  5.5。

罐上用 D-葡萄糖补加液(%):D-葡萄糖 50, 玉米浆 0.5,  $\text{CaCO}_3$  15。

以上培养基均以自来水配制, pH 7.0,  $0.55 \times 10^5 \text{ Pa}$  灭菌 20min。

### 1.3 发酵设备

5L, 15L, 147L B. Braun 自控发酵罐。

### 1.4 培养条件

**1.4.1 摇瓶发酵条件:**斜面 28℃ 培养 24h, 洗下菌悬液接入种子摇瓶, 往复式摇床(转速 220r/min, 28℃)培养 12h, 以 10% 接种量接入发酵摇瓶, 发酵 64~72h。

**1.4.2 罐上发酵条件:**发酵培养基体积约占罐

容积的 60%，D-葡萄糖浓度为 20%，接种量 10%；温度 28~30℃；初始搅拌速度 200r/min，全程通气量为 0.5，溶氧控制在 10% 以上。若为批加试验，则在残糖降至 8g/100ml 时一次性补加 50% D-葡萄糖溶液；当发酵中残糖用完、搅拌速度下降时即可判断为终点。

1.5 分析方法

1.5.1 D-葡萄糖含量：发酵液离心后适当稀释，取稀释液 5μl，加入 1ml 葡萄糖酶液 (SIGMA 公司)，30℃ 水浴 15min，测定吸光度  $A_{505nm}$ ，具体参照 SIGMA 公司葡萄糖诊断试剂盒使用方法。

1.5.2 Ca-2-KDG 含量：参照 Stubbs 等以旋光法测定<sup>[9]</sup>。

2 结果与讨论

2.1 罐上种子生长曲线

图 1 为 15L 罐上的种子生长曲线，采用优化后的种子培养基，生长对数期明显延长，菌浓增长速度加快，达到平衡期时的菌浓相应提高，同时种液中糖酸转化率也由原先的 59.54% 升至 74.98%。8h 时菌浓达到  $A_{660}$  值 = 1.090。残糖已接近用完，故决定种龄为 6h，即对数后期。

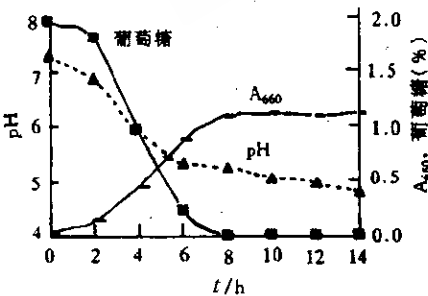


图1 菌株E54罐上种子生长曲线

2.2 摇瓶发酵试验结果

采用不同底物浓度，并配以不同  $CaCO_3$  浓度，进行摇瓶发酵由结果 (表 1) 可以看出，菌株在 18~22g/100ml 的底物浓度下都能正常发酵，转化率均在 90% 左右。但当浓度达到 24g/100ml 时，结果则很不理想，发酵 64h 后

发酵液中残糖浓度仍较高，且菌浓较低，说明过高的糖浓度会抑制菌体生长产酸。故决定采用中期批加 D-葡萄糖的方法来增加总糖浓度，以提高发酵水平。

表1 摇瓶发酵中不同底物浓度对产酸的影响

批号	D-葡萄糖 (g/100ml)	Ca-2-KDG (g/100ml)	克分子转化率 (%)
1	21.79	23.71	91.95
2	21.11	22.08	88.39
3	19.36	20.79	90.75
4	17.84	19.00	90.00
5	18.65	19.24	87.18
6	24.75*	17.14	64.25

注：\*发酵结束时残糖浓度为 8.78g/100ml。

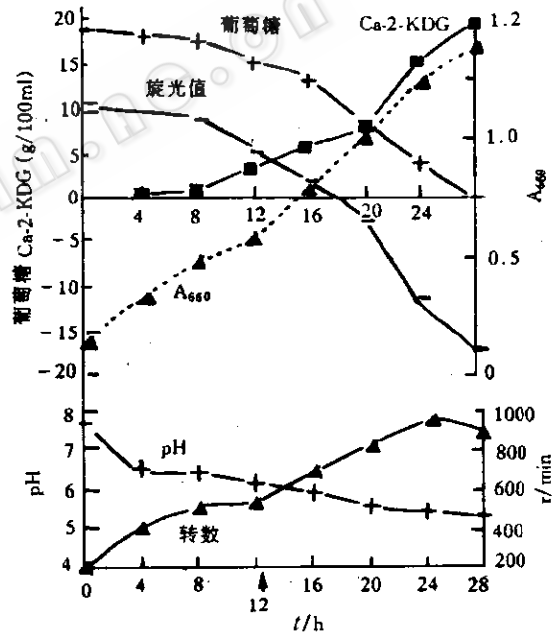


图2 菌株E54在5L罐中的发酵代谢曲线  
13h加入尿素适量

2.3 5L 罐上发酵过程的研究

图 2 为 5L 罐发酵代谢曲线。种液菌浓为  $A_{660nm} = 1.236$ ，接种量 10%，整个发酵过程持续 28h，最终由 20.55g/100ml 的 D-葡萄糖得到 19.40g/100ml 的 Ca-2-KDG，克分子转化率达 87.36%。由图 2 还可以看出整个发酵过程中 pH 均呈下降趋势，这与其它一些产

2-KDG菌株发酵过程中pH先降后升的性状有所不同<sup>[10]</sup>。

此外,鉴于菌体生长与产酸之间的密切关系,在发酵过程中补加尿素(图2),以影响菌体生长并进而改善产酸情况。

## 2.4 采用批加的方法来提高投糖浓度的发酵试验

发酵培养基中初始糖浓度为20g/100ml左右,考虑到较高糖浓度对菌体生长的抑制作用,当22h残糖低于8g/100ml时一次性补加50% D-葡萄糖溶液,同时加入其他辅料(CaCO<sub>3</sub>、玉米浆、尿素)。由于补加糖后菌体生长仍能维持较高水平,产酸未受明显影响。整个发酵周期为35h,总糖浓度为24.95g/100ml,产酸25.17g/100ml,克分子转化率达91.17%。

## 2.5 147L罐上发酵扩大试验

以15L罐作种子罐,接种量10%,不批加试验初糖浓度为18.29g/100ml,最终产酸18.21g/100ml,克分子转化率为88.95%,发酵周期33h;批加试验中初始糖浓度为20.13g/100ml,发酵中期残糖降至12g/100ml左右时补加D-葡萄糖,使总投糖浓度达到24.92g/100ml,最终产酸26.34g/100ml,克分子转化率为89.32%,发酵周期46h,其发酵代谢曲线见图3。

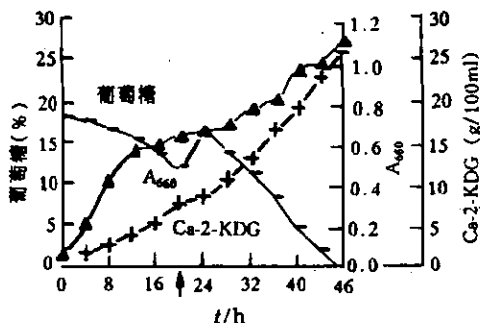


图3 菌株E54在147L罐中的批加发酵代谢曲线

与5L罐发酵结果比较,147L罐中产酸水平并不低,但发酵周期都偏长。究其原因,一是由于设备上的原因,发酵培养基中D-葡萄糖没

能分消,导致灭菌时损耗严重,虽然及时通过补加使之达到要求,但其他组分(如玉米浆和尿素)相应稀释,由此影响了菌体生长,进而影响发酵进程;二是批加试验中补加糖过早,当时发酵液中残糖尚有12g/100ml左右,补加后过高的糖浓度影响了此后菌体的生长。虽然这些是不利因素,但到了工业化生产上都将能解决。

间接发酵法虽已很成熟,但目前生产上使用的多为假单胞菌,投糖浓度仅为16~18g/100ml,且存在着易为噬菌体和杂菌感染的不足,安徽大学还进行了抗噬菌体菌株的选育研究<sup>[11]</sup>。我们采用不同的D-葡萄糖浓度和发酵条件,在5L和147L罐上进行了多批试验,E54均显示了良好的抗噬菌体和抗染菌能力。采用批加工艺和优化的培养条件之后,该菌株在保持高转化率的同时,增加了总投糖浓度,缩短了发酵周期,培养基配方也更简单价廉,符合工业化生产的要求。

致谢:有关该菌的前期研究中科院北京微生物研究所梁改芹、曹桂芳同志做了很多工作,在此致以衷心感谢。上海大学陈安同学参加此项工作,叶晴同志负责菌种保藏工作,一并致谢。

## 参 考 文 献

- [1] 近藤修. 特许公报, 昭 47-7247.
- [2] 小原正郎. 特许公报, 昭 38-22562.
- [3] Bernhauer K, Gorlich B. *Biochem Z*, 1935, 280: 367.
- [4] Kulka D, Walkew T K. *Arch Biochem Biophys.*, 1954, 50: 169.
- [5] 白照照, 蒋明珠. *生物研究通报*, 1984, 2(3): 31~34.
- [6] 梁改芹, 曹桂芳, 尹光琳. *微生物学通报*, 1987, 14(6): 246~248.
- [7] 尹光琳, 曹桂芳, 梁改芹. *微生物学报*, 1988, 28(1): 6~11.
- [8] 曹桂芳, 梁改芹, 尹光琳. *微生物学通报*, 1988, 15(1): 7~11.
- [9] Stubbs J J, Lockwood L B, Roe E T. *et al. Ind. Eng Chem*, 1940, 32: 1626~1631.
- [10] 蒋明珠, 白照照. *微生物学通报*, 1983, 10(3): 103~106.
- [11] 沈淑瑜, 王怡平, 许鸿发等. *微生物学通报*, 1996, 23(5): 282~284.

## IMPROVEMENT ABOUT FERMENTATION CONDITION OF E54 PRODUCING Ca-2-DKG—THE PRECURSOR OF SODIUM D-ISOASCORBATE

He Jianming Yin Guanglin

(Shanghai Research Center of Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233)

**Abstract** *Alcaligenes ketogenes* nov. sp. E54 could convert D-glucose to Calcium 2-keto-D-gluconate, the precursor of Sodium D-isoascorbate during the fermentation. Our research was involved in jar-scale studies of this course. Some progress was achieved recently, by applying fed-batch method to raise concentration of D-glucose, and further optimization of medium composition and fermentation control. Now, the strain could use 20~25g / 100ml D-glucose after cultured for 36 hours in 5L fermentor, with a yield of about 90%; while in 147L fermentor, 18~25g / 100ml D-glucose was converted with the same yield during a period of about 40 hours.

**Key words** *Alcaligenes ketogenes* nov. sp., D-glucose, Fermentation, Calcium 2-keto-D-gluconate, Fed-batch