

微生物混合培养从 D-山梨醇产生维生素 C 前体 —2-酮基-L-古龙酸发酵条件的研究*

林文楚 叶 晴** 乔春红 尹光琳

(中国科学院上海生命科学研究院上海生物工程研究中心 上海 200233)

摘要: 在成功利用 SCB329 和 SCB110 混合培养完成从 D-山梨醇转化产生 2-酮基-L-古龙酸的基础上。为了消除副产物和获得高的产量, 首先对两菌搭配比例, 初始 pH 值、培养基成分等发酵培养条件进行单因子实验, 在此基础上采用 $L_9(3^4)$ 正交实验优化其发酵培养基, 其最终的优化培养基的成分为: D-山梨醇 9g, 玉米浆 1.5g, 尿素 1.5g, 磷酸二氢钾 0.1g, 碳酸钙 0.2g。用优化后的培养基发酵, 没有检测出副产物 2-酮基-D-古龙酸, 2-酮基-L-古龙酸产量提高了 20%。

关键词: 混合培养, D-山梨醇, 2-酮基-L-古龙酸, 正交实验

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 04-0037-05

STUDY ON THE FERMENTATION CONDITION PRODUCING 2-KETO-LGLUCONIC ACID BY USING MIXED CULTURE OF MICROORGANISM

LIN Wen-Chu YE Qing QIAO Chun-Hong YIN Guang-Lin

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

Abstract: Vitamin C precursor--2-keto-L-gulonic acid can be prepared directly by mixed culture of *Gluconobacter oxydans* SCB329 and *Gluconobacter suboxydans* SCB110. To obtained its high yield, firstly, the proportion of the two micro-

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39970024)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39970024)

河北维生药业公司科研合作经费资助项目

** 联系人 Tel: 021-64700892-358, E-mail: glyin@srb. ac. cn

收稿日期: 2001-05-10, 修回日期: 2001-08-26

organisms, the ingredients of medium and the initial pH were optimized in shake flaskd, then $L_9 (3^4)$ orthogonal experiment confirmed that urea, C. S. L had high degree statistical meaning. Based on these data, an optimized fermentation media was obtained: D-Sorbitol 9g, C. S.L 5g, Urea 5g, KH_2PO_4 0.1g, $CaCO_3$ 0.2g. By-product can be inhibited to the greatest extent and the yield increases by 20%.

Key words: Mixed culture, D-sorbitol, 2-keto-L-gluconic acid, Orthogonal experiments

前文已报道了混合培养完成从 D-山梨醇转化产生维生素 C 的前体—2-酮基-L-古龙酸 (简称 2-KLG) 的混合菌-葡萄糖酸杆菌 SCB110 和氧化葡萄糖酸杆菌 SCB329 的生物学特性, 介绍了其产 2-KLG 的能力, 并对其产物进行了鉴定^[1]。为了提高其产酸的能力和消除副产物 2-酮基-D-古龙酸 (简称 2-KDG) 的影响, 我们对混合培养的菌体比例、发酵培养基的组成和培养条件进行了优化。本文主要报道混合培养的发酵条件。

1 材料与方法

1.1 菌种

葡萄糖酸杆菌 (*Gluconobacter* sp.) SCB110, 氧化葡萄糖酸杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) SCB329, 均由本实验室保存。

1.2 培养基

斜面培养基: (1) *Gluconobacter* sp. 培养用 D-山梨醇-酵母膏培养基: 参考文献 [1]。(2) *Gluconobacter oxydans* SCB329 培养用 L-山梨糖固体培养基: 参考文献 [1], 种子培养基: 即 D-山梨醇-酵母膏液体培养基: 参考文献 [1]。

优化前的发酵培养基: D-山梨醇 8g, 玉米浆 1g, 尿素 1.5g (分消), KH_2PO_4 0.1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g, $CaCO_3$ 0.6g, 定容至 1L, pH 7.0, 1.03×10^6 Pa, 20 min 灭菌。

优化后的发酵培养基: D-山梨醇 9g, 玉米浆 1.5g, 尿素 1.5g (分消), KH_2PO_4 0.1g, $CaCO_3$ 0.2g, 定容至 1L, pH 7.0, 1.03×10^6 Pa, 20 min 灭菌。

1.3 培养条件

Gluconobacter sp. SCB 110 和 *Gluconobacter oxydans* SCB329 的混合培养发酵: 见参考文献 [1], 接种比例根据需要调整。

单因子条件优化: 在首先优化混合菌的接种比例和初始 pH 的基础上进行, 除了优化的单因子外, 培养基的其它成分同优化前的培养基成分^[2]。

条件优化的正交实验: 按照 4 因素, D-山梨醇, $A_1 = 7g$, $A_2 = 8g$, $A_3 = 9g$; 玉米浆 (%), $B_1 = 0.5g$, $B_2 = 1.0g$, $B_3 = 1.5g$; 尿素 (%), $C_1 = 1.0g$, $C_2 = 1.5g$, $C_3 = 2.0g$; 碳酸钙 (%), $D_1 = 0.2g$, $D_2 = 0.4g$, $D_3 = 0.6g$, 三水平安排正交表 $L_9 (3^4)^{[3, 4]}$, 以 2-酮基-L-古龙酸 (2-KLG) 的生成量为指标, 每组重复两次。

1.4 分析方法

1.4.1 种子菌体浓度的测定: 种子培养 18~24h 后取 0.5mL 用 0.1mol/L HCl 4.5mL 稀释, 在波长 620nm 用分光光度计比色测生长吸光度。

1.4.2 2-酮基-L-古龙酸 (2-KLG) 和 L-山梨糖含量测定: 按文献 [1, 5, 6] 方法进行。

1.4.3 发酵液中残余 D-山梨醇分析: 参见文献 [1]。

1.4.4 中间产物、产物的定量测定: 用高压液相层析法进行测定^[7]。将发酵液进行絮凝处理和离心后, 取上清液 20~100 μ L 上样。Bio-Rad A-27 树脂填充柱 (4.6 \times 250mm),

45℃, HPLC 流动相为 0.1 mol/L 甲酸铵 (pH3.2), 流速 1.0mL/min。

2 结果

2.1 混合菌的接种比例对产酸的影响

当 SCB110 与 SCB329 的接种比例变化时, 2-酮基-L-古龙酸的生成量是不同的, 且副产物 2-酮基-D-古龙酸也随之变化。当 SCB110 与 SCB329 的比例在 4:1 ~ 1:1 之间时, 2-酮基-L-古龙酸的量较高, 薄层分析未检测到 D-山梨醇。当种子中 SCB329 过多时, 目的产物迅速减少。此外, 当二者比例在上述范围内时, 副产物 2-KDG 未检测到, 而比例在 1:1 ~ 1:4 时 2-KDG 明显增多, D-山梨醇有残留斑点。说明只要二者比例恰当, 可以减少副产物、提高目的产物 2-酮基-L-古龙酸的产量。

2.2 初始 pH 对产酸的影响

结果见图 1, pH7.0 左右产酸量最高。

2.3 D-山梨醇对产酸的影响

随着底物 D-山梨醇的浓度的增高, 产酸量在上升, 浓度越高, 上升趋势越慢, 且残留 D-山梨醇越多。考虑到转化率, D-山梨醇的浓度不能过高, 在 7% ~ 9% 较为合适。

2.4 玉米浆对产酸的影响

结果见图 2, 玉米浆浓度在 1.5% 效果最好。

2.5 尿素对产酸的影响

结果见图 3, 尿素浓度在 1.2% 左右效果最好。

2.6 碳酸钙对产酸的影响

碳酸钙对产酸影响不大, 变化趋势比较平缓。

2.7 条件优化的正交实验

$L_9 (3^4)$ 正交实验及方差分析结果见表 1, 4 个主效应 F 值大于 $F_{0.05(2, 18)} = 3.55$, 二者有高度的统计学意义。

对产酸有影响, 次序为尿素、D-山梨醇、碳酸钙和玉米浆, 最优的发酵条件为 $A_3 B_3 C_2 D_1$ 。结合单因子实验结果和实际情况确定培养基最佳配比是: D-山梨醇 9g, 玉米浆 1.5g, 尿素 1.5g, KH_2PO_4 0.1g, $CaCO_3$ 0.2g。

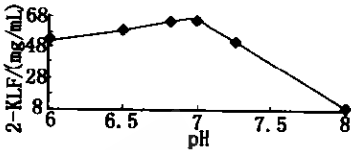


图 1 初始 pH 值对产酸影响

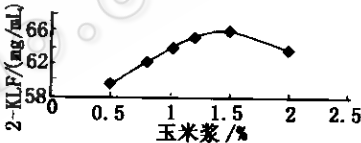


图 2 玉米浆对产酸的影响

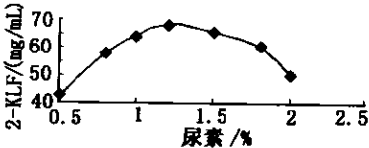


图 3 尿素对产酸的影响

表 1 正交实验结果及方差分析

实验号	D-山梨醇	玉米浆	尿素	碳酸钙	结果 I	结果 II	I + II	δ/i
1	1	1	1	1	59.0	60.6	119.6	1.28
2	1	2	2	2	55.1	60.6	115.7	15.13
3	1	3	3	3	49.5	50.7	100.2	0.72
4	2	1	2	3	63.2	60.6	123.8	7.21
5	2	2	3	1	62.2	59.4	121.6	3.92
6	2	3	1	2	64.8	66.8	131.6	2
7	3	1	3	2	52.7	54.3	107	1.28
8	3	2	1	3	70.2	69.4	139.6	0.32
9	3	3	2	1	80.1	74.5	154.6	15.68
K_1	335.5	350.4	390.8	395.8				
K_2	377	376.9	394.1	354.3	G		1113.7	
K_3	401.2	386.4	328.8	363.6	P		68907.1	
Q	69275.1	69023.1	69358.1	69065.2	SE		58.52	
S	368	116	451	158.1	SE/9		13	
F	28.3	8.92	34.69	12.16				

2.8 温度对产酸的影响

考察了 25℃, 28℃, 30℃, 32℃, 35℃, 37℃ 条件下产酸情况, 温度对产酸影响很大。在 28℃~30℃ 酸的产量最高, 温度越高。产酸越受影响, 35℃ 时产酸已经很低, 37℃ 时不产酸。

2.9 装液量对产酸的影响

装液量对产酸有一定影响, 装液量越多, 产酸量越低。一般选取 500mL 锥形瓶装液 50mL 为适宜。

表 2 优化后产酸发酵结果

优化前	84h	96h	优化后	84h	96h
1	65.1	65.9	1	75.7	76.8
2	64.7	66.2	2	76.4	77.2
3	63.4	64.8	3	73.8	76.9

2.10 优化后产酸发酵结果

用优化后的培养基和培养条件与优化前的培养基对照, 进行 500mL 摇瓶分批发酵实验, 结果如表 2 所示。使用优化发酵培养基, 2-KLG 的产量有

显著的提高, 同时发酵时间可以缩短为 84h。这对工业化生产有着显著的实际意义。

2.11 底物、中间产物、产物与发酵时间曲线

在 pH、温度的优化条件下, 一次投入 D-山梨醇 9%, 混合发酵 84h, 生成 2-酮基-L-古龙酸 74.5mg/mL, 由底物、中间产物、产物与发酵时间曲线显示, 随着发酵时间的延长, 底物很快降低到 0, 中间产物 L-山梨糖先上升, 在 24h 左右到达顶峰, 随后逐渐降低在 72h 时已检测不到 L-山梨糖。而底物 2-酮基-L-古龙酸开始 8h 不生成, 8h 后生成速度急剧增加。在 D-山梨醇、L-山梨糖已残留很少时生成 2-酮基-L-古龙酸的速度仍然很高。但一次投山梨醇过多又不利于 2-酮基-L-古龙酸的转化, 因此在以后的工作中可以考虑分批投醇糖或者进行流加, 以充分发挥 2-酮基-L-古龙酸的生成潜力。

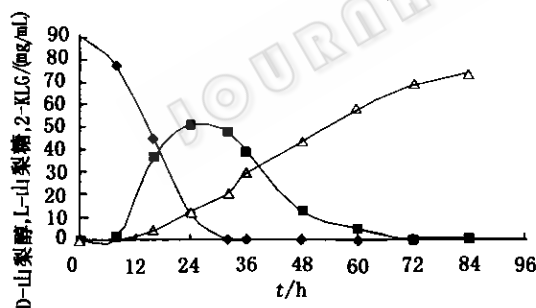


图 4 底物、中间产物、产物与发酵时间曲线

◆ D-山梨醇 (mg/mL) ■ L-山梨糖 (mg/mL)
--△-- 2-KLG (mg/mL)

3 讨论

目前微生物发酵生成维生素 C 由于生产工艺简单、对生态环境影响小而受到越来越多的重视。但是迄今为止只有我国独创发明的“两步发酵法”应用于工业生产^[5]。着眼于目前的市场现状和改进工艺的要求, 有必要探索新的生产工艺。本研究正是着眼于 D-山梨醇是一种廉价的碳源这一点, 对混合菌利用 D-山梨醇直接发酵生成 2-KLG 的培养基和

培养条件进行了优化, 并获得了较好的结果, 采用摇瓶发酵单次投糖可以产生高达 74.5mg/mL 的 2-酮基-L-古龙酸, 并且可以缩短发酵时间, 由 96h 减少为 84h。在“两步发酵法”中, 底物 L-山梨糖浓度上不能超过 8% 这一上限的, 而在混合菌发酵中通过优化发酵条件, 其单次底物浓度可以达到 9%, 它预示着底物浓度可以更高, 将为高底物浓度发酵生产 2-KLG 打下基础。这一研究不仅可以为微生物方法生产维生素 C 提供新的思路, 而且对实现工业化生产具有一定的实际意义。

致谢 严明, 权宁 (华东理工大学 96 级) 在本研究中作了部分工作, 特此致谢。

参考文献

- [1] 尹光琳, 林文楚, 乔春红, 等. 微生物学报, 2001, 41 (6): 709 ~ 715.
- [2] European Patent. 1992, 0, 518, 136, A2.
- [3] 李春喜编. 生物统计学, 北京: 科学出版社, 1997. 100 ~ 104.
- [4] 李明, 修朝阳, 陈常庆. 生物工程学报, 2000, 16 (2): 183 ~ 187.
- [5] 尹光琳, 陶增鑫, 严自正, 等. 微生物学报, 1980, 20 (3): 246 ~ 251.
- [6] 尹光琳, 何建明, 任双喜, 等. 工业微生物, 1997, 27 (1): 1 ~ 7.
- [7] Robert A, Lazarus, Jana L. Seymour. Analytical Biochemistry, 1986, 157: 360 ~ 366.