

# D-葡萄糖直接发酵产生维生素 C 前体——2-酮基-L-古龙酸的研究

## II. 2,5-DKG 产酸菌株发酵条件

马志方 董文玲 王毅武 叶 晴 尹光琳

(中国科学院上海生物工程研究中心, 上海)

**摘要** 本文研究了 D-葡萄糖两步串联发酵中前一步菌株的发酵产酸条件。实验结果表明,在含有 D-葡萄糖、适量的玉米浆、碳酸钙和磷酸盐的培养基中,摇瓶培养 48 小时,一株葡萄糖酸杆菌突变株 SCB611 可产生 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸 25—30mg/ml,克分子转化率为 25% 左右;另一株欧文氏菌突变株 SCB247 可产生 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸 45—50mg/ml,克分子转化率为 40%。随发酵时间适当延长,2,5-二酮基-D-葡萄糖酸可逐渐增高。温度 28℃,种龄 15 小时,接种量 10% 及良好的通气条件,有利于菌株产生 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸。

**关键词** 葡萄糖酸杆菌;欧文氏菌;2,5-二酮基-D-葡萄糖酸(盐);2-酮基-L-古龙酸

近十多年来,国外对以 D-葡萄糖为底物,经 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸(盐) (2,5-diketo-D-gluconate,以下简称 2,5-DKG) 发酵生成维生素 C 重要前体-2-酮基-L-古龙酸 (2-Keto-L-gulonic acid, 以下简称 2-KLG) 已有过许多报道<sup>[1-3]</sup>。用葡萄糖替代 D-山梨醇作为生产原料,不仅大大简化了 Reichstein 法<sup>[4]</sup>维生素 C 生产的复杂工艺路线,也比 70 年代我国首创的“二步发酵法”<sup>[5]</sup>从原料简化方面有所改进。

前文<sup>[6]</sup>已报道了菌种的诱变选育和代谢产物的鉴定结果,本文着重介绍两步串联发酵中的前一步葡萄糖酸杆菌的发酵条件的研究结果。

## 材 料 和 方 法

### (一) 试验菌株

葡萄糖酸杆菌 (*Gluconobacter* sp.) SCB611;欧文氏菌 (*Erwinia* sp.) SCB247。

### (二) 培养基

除了文中特别指出的培养基外,其余均同前报<sup>[6]</sup>。

### (三) 培养条件

除了文中指定的条件外,其余同前报<sup>[6]</sup>。种子培养条件是 28℃ 振荡培养(转速 250r/min) 15 小时;发酵条件是 28℃ 振荡培养(转速 250 r/min)48 小时,接种量为 10%。

### (四) 分析测定方法

2,5-DKG 测定方法: 参照园山高康的  $\text{NH}_4\text{OH-HCl}$  法<sup>[2]</sup>修改后测定。

pH 值、菌体生长、D-葡萄糖含量测定等均同前报<sup>[6]</sup>。

### (五) 克分子转化率的计算

$$\frac{\text{生成 2,5-DKG 量 mg/ml}}{\text{加入 D-葡萄糖量 mg/ml}} \times \frac{\text{D-葡萄糖分子量}}{\text{2,5-DKG 分子量}} \times 100\%$$

## 结 果 和 讨 论

### (一) 不同碳源的利用

葡萄糖酸杆菌 SCB611 和欧文氏菌 SCB247 都能利用 D-葡萄糖产生 2,5-DKG,为证实对其他碳源的利用情况,进行以下碳源比较实验。

从表 1 中可以看出,无论菌株 SCB611 或 SCB247,只能利用 D-葡萄糖作碳源产 2,5-

表 1 SCB611 和 SCB247 对不同碳源的利用\*

结 果 碳 源	菌株	SCB611		SCB247	
		OD <sub>460nm</sub> (100×)	2,5-DKG(mg/ml)	OD <sub>460nm</sub> (100×)	2,5-DKG(mg/ml)
D-葡萄糖		0.27	22.73	0.41	34.51
果糖		0.036	3.05	0.02	1.71
淀粉		/	/	/	/
蔗糖		/	/	/	/
山梨糖		0.0013	0.14	/	/
甘油		/	/	/	/
乳糖		/	/	/	/

\* 碳源的含量都为 5%(W/V)。除碳源不同外,培养基其他成分相同。

DKG。菌株 SCB611 和 SCB247 在果糖、蔗糖、甘油和淀粉培养基中虽然生长旺盛,但都不产酸。

(二) 不同氮源的利用

比较了菌株 SCB611 和 SCB247 对十种有机、无机氮源的利用。从表 2 可见,菌株 SCB611 对上述十种有机、无机氮源都能利用,生成的 2,5-DKG 量相差不大,无机氮源中以磷酸

氢二铵为最好;有机氮源中以蛋白胨最好,玉米浆次之。而菌株 SCB247 对十种氮源的利用差异极大,利用磷酸盐、酵母粉产酸很高;对牛肉膏、蛋白胨、硫酸铵则几乎不产酸。加入磷酸氢二铵作氮源,对两株菌优化产酸条件都有作用。

(三) 温度试验

比较了四种不同温度对 SCB611 和 SCB247 产 2,5-DKG 的影响。

表 2 SCB611 和 SCB247 对不同氮源的利用\*

结 果 氮 源	菌株	SCB611		SCB247	
		OD <sub>460nm</sub> (100×)	2,5-DKG (mg/ml)	OD <sub>460nm</sub> (100×)	2,5-DKG (mg/ml)
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		0.220	18.61	0.468	39.38
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		0.198	19.62	0.515	43.33
尿素		0.212	16.76	0.097	8.18
NaNO <sub>3</sub>		0.248	14.99	0.112	9.44
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		0.208	13.98	0.038	3.22
玉米浆		0.223	18.55	0.332	27.94
酵母膏		0.233	16.68	0.380	31.98
牛肉膏		0.199	18.19	0.092	0.80
蛋白胨		0.178	20.96	0.030	2.55
水解酪素		0.166	17.52	0.110	9.28

\* 培养基中 D-葡萄糖含量 5%(W/V),各种有机氮源含量均为 3%(W/V),各种无机氮源含量均为 0.1%(W/V)。

表 3 温度对产 2,5-DKG 的影响

结 果 温 度	菌株	SCB611				SCB247			
		终 pH	OD <sub>460nm</sub> (100×)	2,5-DKG (mg/ml)	转化率 (%)	终 pH	OD <sub>460nm</sub> (100×)	2,5-DKG (mg/ml)	转化率 (%)
20℃		4.80	0.360	30.30	25.85	4.69	0.462	38.87	33.16
28℃		4.72	0.371	31.15	26.56	4.38	0.516	43.42	37.04
37℃		5.82	0.127	10.71	9.14	4.73	0.213	17.93	15.29
42℃		6.86	/	/	/	5.23	0.0187	1.60	/

从表 3 可见,不同温度对两株菌产生 2,5-DKG 的影响均很大,在温度 20—28℃ 范围内产酸量稳定,以 28℃ 更适宜。37℃ 时产酸量明显下降,42℃ 时菌株 611 不再产酸,菌株 247 产酸量几乎难以测出。

(四) D-葡萄糖浓度与产酸关系

从图 1 中可看出,当底物浓度为 10% 时,2,5-DKG 的产量最高,而 5% D-葡萄糖的转化率最高。当 D-葡萄糖浓度高达 20% 时,2,5-DKG 产量明显下降。

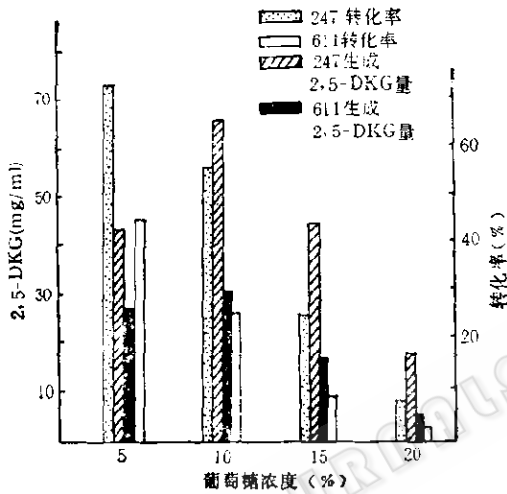


图 1 D-葡萄糖与菌株生成 2,5-DKG 转化率关系图

(五) 通气量试验

氧在微生物生长中起重要作用<sup>[7]</sup>, 葡萄糖

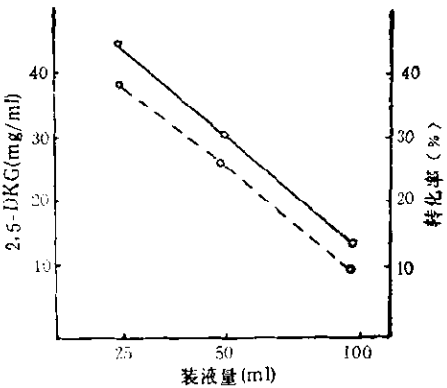


图 2 通气量和产酸关系曲线

○——○ 2,5-DKG 量; ○-----○ 转化率

酸杆菌 SCB611 和欧文氏菌 SCB247 均系好氧性细菌,通气量减少会明显影响其生长和 2,5-DKG 生成量。以菌株 SCB611 为例,用 500 毫升三角瓶装入不等量的发酵液,比较通气量对产酸的影响。从图 2 可见,在 500 毫升三角瓶中装液量为 25ml 时产生 2,5-DKG 量和转化率最高。

(六) 发酵培养基的起始 pH 对产酸的影响

将菌株 SCB611 和 SCB247 种液分别接种至不同 pH 的发酵培养基内,于 28℃ 振荡 48 小时,测定 2,5-DKG 含量,结果见表 4。SCB 611 和 SCB 247 生长的最适 pH 都是 6.0—7.0, 从表 4 结果可以看到,无论菌株 SCB611 或

表 4 发酵培养基起始 pH 对 2,5-DKG 产生的影响\*

结 果 起始 pH	菌株	SCB611			SCB247		
		终 pH	OD <sub>460nm</sub> (100×)	2,5-DKG (mg/ml)	终 pH	OD <sub>460nm</sub> (100×)	2,5-DKG (mg/ml)
4.5		4.73	0.145	12.22	4.18	0.388	32.65
5.5		4.37	0.140	11.80	4.29	0.374	31.47
6.0		4.64	0.225	18.95	4.30	0.510	42.91
6.5		4.56	0.172	14.49	4.36	0.474	39.88
7.0		4.62	0.168	14.15	4.38	0.480	40.39
7.5		4.59	0.178	14.99	4.35	0.428	36.02
8.0		4.67	0.172	14.49	4.39	0.421	35.43
9.0		4.81	0.167	14.07	4.38	0.490	41.23

\* D-葡萄糖含量均为 5%(W/V)。

SCB247,对起始 pH(4.5—9.0) 变化均不敏感。当发酵结束后, pH 均在 4.2—4.8 之间, 2,5-DKG 产量差异也不大。

(七) 种龄和种量试验

将菌株 SCB611 和 SCB247 的种子培养液在 28℃ 振荡培养 15、18 和 24 小时后, 分别以 10% 的接种量接入发酵培养基中, 28℃ 振荡培养 48 小时, 测定 2,5-DKG 量, 比较种龄对产酸的影响。结果表明, 两株菌均以种龄 15 小时为宜(图 3)。

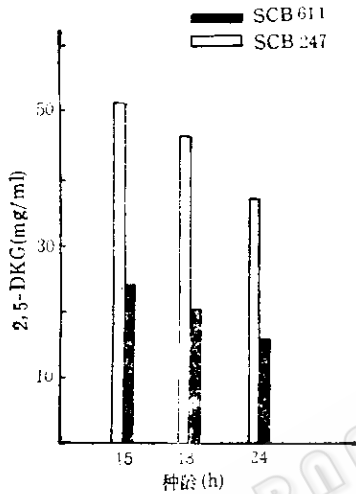


图 3 菌株 SCB611 和 SCB247 不同种龄对 2,5-DKG 生成的影响

将 28℃ 振荡培养 15 小时的菌株 SCB611 和 SCB247 种液以 5%、10% 和 20% 的不同接种量分别接入发酵培养基内, 28℃ 振荡培养 48 小时, 测定 2,5-DKG 量。结果表明, 菌株接种量以 10% 最好。

(八) 发酵培养基正交试验

发酵培养基中除葡萄糖(10%)外, 对其他几种成分玉米浆、CaCO<sub>3</sub>、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 进行正交试验。以菌株 SCB611 为例, 表 5、6 分别列出试验因子、水平和试验结果。

从结果看出, 试验号 1—7, 生成 2,5-DKG 量比较接近, 其中 1, 3, 5 号产酸量较高, 可见 CaCO<sub>3</sub> 和 NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 是培养基中必需的成分。

(九) 发酵全过程

为考察产生 2,5-DKG 菌株在摇瓶中发酵产酸的全过程, 以菌株 SCB247 为例, 在 28℃

表 5 培养基正交试验

试验号	因子及水平(%)			
	A	B	C	D
1	1	2.4	0.05	0.05
2	1	3.2	0	0.02
3	1	1.6	0.1	0
4	3	2.4	0	0
5	3	3.2	0.1	0.05
6	3	1.6	0.05	0.02
7	5	2.4	0.1	0.02
8	5	3.2	0.05	0
9	5	1.6	0	0.05

A: 玉米浆; B: CaCO<sub>3</sub>; C: NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; D: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

表 6 正交试验结果

试验号	结果	菌株	SCB611		
			终 pH	OD <sub>660nm</sub> (100×)	2,5-DKG (mg/ml)
1			4.73	0.440	37.02
2			5.20	0.385	32.40
3			4.53	0.469	39.46
4			4.98	0.381	32.06
5			4.62	0.445	37.44
6			4.48	0.393	33.07
7			4.55	0.370	31.14
8			4.72	0.342	28.78
9			4.70	0.348	29.29

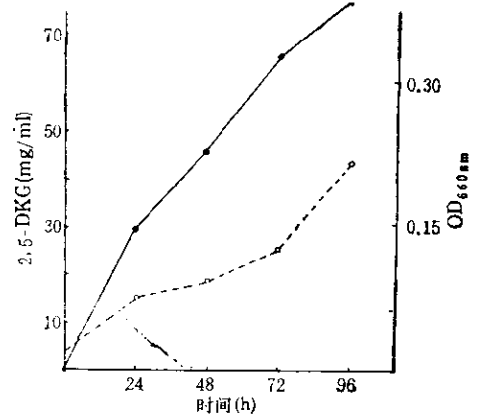


图 4 SCB247 发酵产酸全过程

○—○ 2,5-DKG 量 ○-----○ 菌株生长吸光度

振荡培养 96 小时, 分别在不同时间取样测定。从图 4 可见, 摇瓶发酵 12 小时左右进入对

数期, 24 小时之前即开始产酸。

菌株 SCB611 和 SCB247 产生 2,5-DKG 的各种发酵条件, 归纳如下:

1. 最适发酵温度为 28℃, 37℃ 后产酸明显下降。

2. 通气量好产酸量相应也高。本文中 以 500 毫升三角瓶装 25 毫升容量的产酸结果最好。

3. 当种龄 15 小时, 接种量 10% 时, 对产酸最有利。

4. 菌株在以 5% D-葡萄糖作为底物时, 克分子转化率最高, 而 10% D-葡萄糖时, 产酸值最高。

在上述最适条件下, SCB611 经 48 小时发酵产酸 25—30mg/ml, 克分子转化率达 25%; SCB247 产酸 45—50mg/ml, 克分子转化率达 40%。

### 参 考 文 献

1. Sonoyama T et al.: U.S. Patent, 3922194, 1975.
2. Sonoyama T et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**: 1064—1069, 1982.
3. Anderson S et al.: *Science*, **230**:144, 1985.
4. Reichstein T et al.: *Helv. Chim. Acta.*, **17**:311—328, 1934.
5. 尹光琳等: 微生物学报, **20**: 246—251, 1980.
6. 尹光琳等: 微生物学报, **3**: 198—205, 1991.
7. Sonoyama T et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**:667—674, 1988.