

D-葡萄糖直接发酵产生维生素 C 前体—— 2-酮基-L-古龙酸

III. SCB3058 对 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸到 2-酮基-L-古龙酸的转化

董文玲 马志方 邓贻默 林海 尹光琳

(中国科学院上海生物工程研究中心, 上海)

摘要 棒状杆菌 (*Corynebacterium* sp.) 突变株 SCB 3058 将 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸转化为维生素 C 前体-2-酮基-L-古龙酸。含 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸的发酵液经表面活性剂 SDS 处理可直接用作菌株 SCB3058 的转化底物。D-葡萄糖为最佳碳源,同时作为还原的氢供体。培养基中加入 NH_4Cl 对 2-酮基-L-古龙酸的生成有明显的促进作用。转化的最适 pH 为 7.5。摇瓶发酵 64 小时后, 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸到 2-酮基-L-古龙酸的转化率为 50mol%。

关键词 棒状杆菌 SCB 3058; 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸 (2,5-DKG); 2-酮基-L-古龙酸 (2-KLG); 十二烷基硫酸钠 (SDS)

2-酮基-L-古龙酸 (以下简称 2-KLG) 是维生素 C 的重要前体, 经两步化学反应转化为维生素 C^[1]。Sonoyama, T. 等人首先报道了从葡萄糖经两步发酵产生 2-KLG 的研究^[2]。他们发现, 醋酸杆菌属 (*Acetobacter*)、葡萄糖酸杆菌属 (*Gluconobacter*) 和欧文氏菌属 (*Erwinia*) 的某些种菌株^[3]能氧化 D-葡萄糖生成中间体——2,5-二酮基-D-葡萄糖酸 (以下简称 2,5-DKG); 此外, 具有产生 2,5-DKG 还原酶能力的棒状细菌如棒状杆菌属 (*Corynebacterium*) 和短杆菌属 (*Brevibacterium*) 的某些菌株^[4,5]能将 2,5-DKG 还原为 2-KLG。在葡萄糖两步发酵过程中, 棒状杆菌产生的 2,5-DKG 还原酶是最终产酸的关键。

前文^[6,7]报道了从 D-葡萄糖经两步发酵产生 2-KLG 诱变菌株的选育及产物的鉴定, D-葡萄糖到 2,5-DKG 的发酵条件。本文报道棒状杆菌突变株 SCB 3058 利用 2,5-DKG 产生 2-KLG 的研究结果。

材料与方法

(一) 菌株

棒状杆菌 (*Corynebacterium* sp.) 突变株 SCB 3058。

(二) 培养基及培养条件

1. 培养基

(1) 斜面培养基: 常规牛肉汁固体培养基。

(2) 种子培养基 (g/l): D-葡萄糖 10, KH_2PO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, 多聚蛋白胨 5.0, 酵母粉 5.0, 自来水配制, pH7.0。

(3) 发酵培养基 (g/l): D-葡萄糖 10, KH_2PO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, 玉米浆 30, 自来水配制, pH7.0。

2. 培养条件

斜面 $\xrightarrow[28^\circ\text{C}, 48 \text{ 小时}]{}$ 种子培养基 $\xrightarrow[20-24 \text{ 小时}]{28^\circ\text{C}, 250 \text{ r/min}}$

发酵培养基 $\xrightarrow[20 \text{ 小时}]{28^\circ\text{C}, 250 \text{ r/min}}$ 加入 2,5-DKG,

使其终浓度为 1.0% $\xrightarrow[48 \text{ 小时}]{28^\circ\text{C}, 250 \text{ r/min}}$ 测定。

(三) 测定方法

王毅武、叶晴同志参加部分工作, 特此致谢。

- 1. 2,5-DKG: 修改的 $\text{NH}_4\text{OH-HCl}$ 法^[2]。
- 2. 2-KLG: 修改的转化碘量法^[8]及改进的 18-磷钨酸法^[2]。
- 3. 菌体生长: 同前报^[6]。

(四) SDS 对发酵液的处理

将含 2,5-DKG 的葡萄糖酸杆菌 (*Glucobacter* sp.) SCB 611 或欧文氏菌 (*Erwinia* sp.) SCB247 的发酵液中加入表面活性剂 SDS, 28℃, 100r/min 振荡处理 6 小时, 置 4℃ 备用。

(五) 克分子转化率计算

$$\frac{\text{生成的 2-KLG}(\text{mg/ml})}{\text{加入的 2,5-DKG}(\text{mg/ml})} \times \frac{2,5\text{-DKG 分子量}}{2\text{-KLK 分子量}} \times 100\%$$

结果与讨论

1. 表面活性剂对 2,5-DKG 发酵液的处理: 2,5-DKG 的热稳定性试验结果(表 1)表明, 2,5-DKG 对热极不稳定, 因此作为第二步发酵底物的 2,5-DKG 无法热处理灭菌, 虽然采用过滤的方法能达到去除 2,5-DKG 发酵液中菌体活细胞的效果, 但并不适用于大规模发酵。而采用表面活性剂处理 2,5-DKG 发酵液来降低原有的菌体细胞数, 不需要过滤或离心处理便可直接用于后步发酵。

硬脂酸钠、十二烷基硫酸钠 (SDS)、椰子油酰牛磺酸胺(6501)、脂肪醇硫酸钠 (K12)、脂肪醇聚氧乙烯醚 (FAE) 及脂肪醇壬基酚聚氧乙烯醚 (TX10) 都有一定的杀菌作用, SDS、6501、K12 效果较好, 而 SDS 最有效。不同浓度的 SDS 处理结果(表 2)表明, 随着 SDS 浓度的增加, 细胞活菌数相应减少, SDS 浓度为 250 $\mu\text{g/ml}$ 时, 发酵液中活菌数由 10^8 降至 10^3 , 已达到处理效果, 可以直接用于第二步发酵。

表 1 2,5-DKG 热稳定性

处理条件	对照	4℃, 7 天	50℃, 1 小时	120℃, 20min
残留 2,5-DKG (mg/ml)	73.6	68.4	55.7	2.2

表 2 SDS 对 2,5-DKG 发酵液的处理结果

发酵液中 SDS 浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	处理后活细胞数* (个/ml)
100	2.7×10^6
200	3.6×10^4
250	1.4×10^3
300	4.1×10^2
400	5.1×10^1

*处理前活细胞数为 2.5×10^8 个/ml

2. 2,5-DKG 添加方式的影响: 为比较加入 2,5-DKG 对产生 2-KLG 的效果, 分别将纯化的 2,5-DKG 固体溶液、过滤灭菌的 2,5-DKG 发酵液、SDS 处理的 2,5-DKG 以及不同时间加入到棒状杆菌 SCB3058 的发酵液中。结果(图 1)表明, 2,5-DKG 经 SDS 处理后, 不但不降低 2-KLG 生成量, 而且促进了 2-KLG 的产生。2,5-DKG 的加入时间以 16 小时最佳, 20 小时次之。

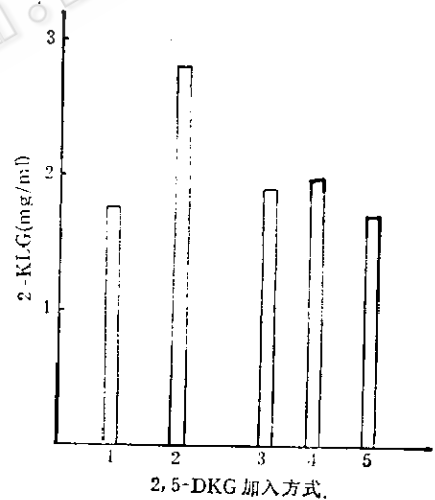


图 1 2,5-DKG 添加方式对生成 2-KLG 影响

- 1. 纯化的 2,5-DKG 固体水溶液 20h
- 2. SDS 处理的 2,5-DKG 发酵液 20h
- 3. 过滤灭菌的 2,5-DKG 发酵液 20h
- 4. 同 3 16h
- 5. 同 3 24h

3. 碳源的影响: 在第二步发酵中, 2,5-DKG 主要是作为底物, 棒状杆菌利用糖类作碳源生长, 当菌生长达对数期中、后期才加入 2,5-DKG。为此, 对几种糖作了比较, 培养基中糖的浓度为 1.0%, 结果见表 3。

表 3 碳源对菌株 SCB3058 产生 2-KLG 影响

碳源	发酵终了 pH	生成 2-KLG (mg/ml)
D-葡萄糖	5.1	2.48
蔗糖	5.3	1.65
L-山梨糖	6.4	1.86
甘油	8.0	0.99
可溶性淀粉	8.0	1.36
乳糖	8.0	1.33
果糖	4.8	1.43

当葡萄糖作碳源时,菌株 SCB3058 生成的 2-KLG 量最高, L-山梨糖次之,甘油最差。在加入 2,5-DKG 发酵液时补加葡萄糖使其在发酵液中终浓度达到 0.2%, 则发酵液中生成的 2-KLG 量可由 2.48mg/ml 增至 2.86mg/ml。从 2,5-DKG 到 2-KLG 是一加氢的还原过程,在这一转化过程中 D-葡萄糖不仅是一最适碳源,同时又是一种良好的氢供体。

4. 氮源的影响: 培养基基本成分 (g/l) 为葡萄糖 10, KH_2PO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, 玉米浆 30, 加入无机氮源, pH 7.0, 28°C, 250r/min 振荡培养 16 小时后加入 2,5-DKG, 继续培养 48 小时。

表 4 氮源对菌株 SCB3058 产生 2-KLG 影响

氮源	加入方式, (浓度%) 时间(h)	发酵终了 pH	产生的 2-KLG (mg/ml)
对照		4.86	2.93
NaNO_2	0(0.25)	4.58	3.37
	0(0.25)+16(0.1)	4.54	3.57
NH_4Cl	0(0.25)	4.55	3.86
	0(0.25)+16(0.1)	4.59	4.39
NH_4NO_3	0(0.25)	4.85	3.09
	0(0.25)+16(0.1)	4.56	3.37

结果(表 4)表明, NH_4NO_3 、 NH_4Cl 、 NaNO_2 对 2-KLG 的生成都有一定的促进作用, NH_4Cl 效果最明显。

5. pH 的影响: 在 2,5-DKG 到 2-KLG 的转化过程中, pH 对棒状杆菌 SCB 3058 的生长及产酸都有一定的影响。调节培养基初始 pH 5.0—9.0, 其它条件同上。

结果(图 2)表明, 培养基 pH 为 7—9 时对产酸最为有利, 当 pH 为 7.5 时, 所生成的 2-KLG 量最高。这与文献报道^[3]的 2,5-DKG 还

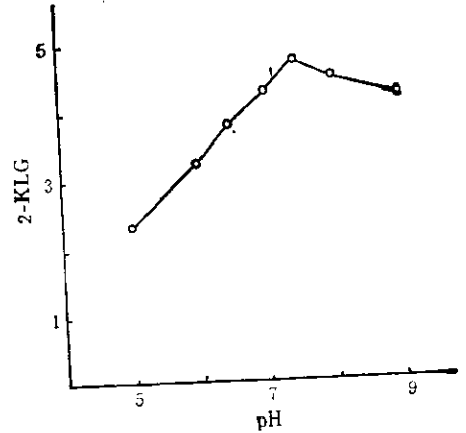


图 2 pH 对菌株 SCB3058 产生 2-KLG 影响

原酶的最适作用 pH 是一致的。

6. 产酸全过程: 培养基及培养条件同上。考察在摇瓶条件下的整个产酸过程(图 3)可以看出, 菌株 SCB3058 在培养 16 小时已达对数中、后期, 只有当 2,5-DKG 加入后才开始产生 2-KLG。发酵 64 小时后, 2-KLG 只有极少量增加, 产酸已趋稳定。生成的 2-KLG 为 4.5—4.75mg/ml, 克分子转化率可达 50%。

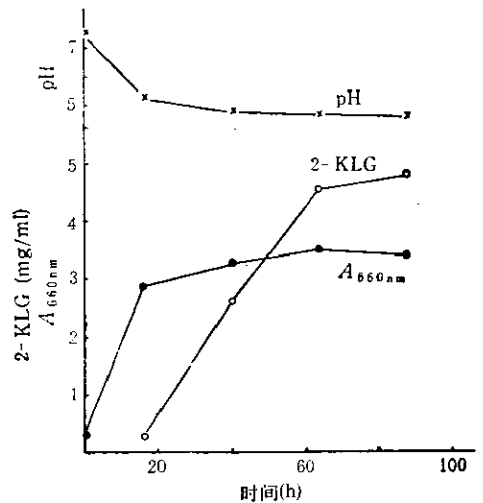


图 3 菌株 SCB 3058 产酸全过程

近年来基因工程技术已用于 D-葡萄糖直接发酵产生 2-KLG 的菌种改良。Anderson^[9,10]、Hardy K.G.^[11] 从棒状杆菌分离得到 2,5-DKG 还原酶基因并克隆, 在欧文氏菌中进行表达, 重组菌可将 D-葡萄糖直接转化为 2-KLG, 展示了基因工程菌应用的前景。目前,

我们已分离纯化了棒状杆菌染色体 DNA, 构建了载体质粒 pBA16, 以 NcoI-SalI 双酶切的质粒 pBA16 片段作载体, 对同样酶切的染色体 DNA 克隆, 已筛选了阳性克隆菌株。

参 考 文 献

1. Reichstein T et al.: *Helv. Chim. Acta.*, **16**: 561—569, 1933.
2. Sonoyama T et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**(5): 1064—1069, 1982.
3. Sonoyama T et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**(3): 667—674, 1988.
4. Sonoyama T et al.: *ibid*, **51**(7): 2003—2004, 1987.
5. Sonoyama T et al.: *ibid*, **51**(11): 3039—3047, 1987.
6. 尹光琳等: *微生物学报*, **31**(3): 198—205, 1991.
7. 马志方等: *微生物学通报*, **18**(4): 207—211, 1991.
8. 尹光琳等: *微生物学报*, **20**(3): 246—251, 1980.
9. Anderson S et al.: *Genetics and Molecular Biology of Industrial Microorganisms*, Chapter VII, 187—193, 1989.
10. Anderson S et al.: *Science*, **230**: 144—149, 1985.
11. Hardy KG et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**(7): 1770—1775, 1988.