

2, 5-二酮基-D-葡萄糖酸产生菌株发酵条件研究

石 岗¹, 颜方贵², 宋维平¹

(1. 北京市农林科学院畜牧兽医研究所, 北京 100089; 2. 中国农业大学 生物学院, 北京 100094)

摘要: 从腐烂苹果、青椒等材料分离得到一株葡萄糖酸杆菌(*Gluconobacter* sp.) A₆ 可将葡萄糖转化为 2, 5-二酮基-D-葡萄糖酸。该菌的发酵条件研究表明, 在含质量浓度 25% 葡萄糖的玉米浆碳酸钙培养基中, 28 ℃ 发酵 7 d 可生成 2, 5-二酮基-D-葡萄糖酸钙 172.0 mg/mL, 转化率为摩尔比 52.05。在耐糖性方面高于国内同类报道。

关键词: 菌株; 2, 5-二酮基-D-葡萄糖酸; 转化率; 耐糖性

中图分类号: S816.79 文献标识码: A 文章编号: 1000- 7091(2002)02- 0132- 05

维生素 C 是人类和动物日粮中的一种重要营养元素。目前维生素 C 的生产主要是通过化学或微生物方法获得 2-酮基-L-古龙酸(2KLG), 再经烯醇化和内酯化而实现的。自从我国发明二步发酵法^[1,2] 生产维生素 C 以来, 为了简化生产, 世界各国都把注意力集中于 2, 5-二酮基-D-葡萄糖酸(2, 5-DKG) 途径研究和基因工程菌的构建上来^[3~7], 并取得可喜成果。为了简化生产, 构建基因工程菌, 降低生产成本, 我们从腐烂苹果、青椒等材料分离得到一株葡萄糖酸杆菌 A₆ 可将葡萄糖转化为 2, 5-DKG。有关该菌株的分离及产物鉴定另文报道。现将该菌株产生 2, 5-DKG 的发酵条件报告如下。

1 材料和方法

1.1 标准品

2, 5-二酮基-D-葡萄糖酸钙, 本实验室保存。

1.2 2, 5-DKG 含量测定

取纯 2, 5-DKG (钙盐) 按 0.10, 0.20, 0.30 ……0.70 mg/mL 7 个浓度配置溶液, 按照修改后的 Sonoyama 定量测定方法(即 NH₄OH-HCl 法)^[4], 吸取每个浓度的溶液 0.6 mL, 放入 7 只试管中, 再取 1 只试管加入 0.6 mL 蒸馏水作对照, 8 只试管中各加入 0.6 mL 12 mol/L CaCl₂, 0.32 mL 1.5 mol/L NH₄OH 和 0.34 mL 4 mol/L HCl, 50 ℃ 水浴加热 10 min 显色, 测出 A_{460nm} 吸收值(OD), 以 OD 为纵坐标、浓度为横坐标, 绘出标准曲线。

根据样品(发酵液)中 2, 5-DKG 的浓度稀释 100~ 400 倍, 吸 0.6 mL 稀释液, 加 CaCl₂, NH₄OH, HCl 和加热等操作与标准曲线制作相同, 测出 A_{460nm} 吸收值, 根据标准曲线, 查出 2, 5-DKG 含量。

收稿日期: 2001- 05- 13
 作者简介: 石 岗(1963-), 男, 助理研究员, 博士研究生, 主要从事微生物发酵和兽医微生物学研究。

1.3 D-葡萄糖含量测定

采用碘量法^[8]进行。取 1 mL 样品液, 加 9 mL H₂O, 0.1 mol/L I₂ 10 mL, 0.1 mol/L NaOH 15 mL, 置暗处 15 min, 加 0.4 mol/L HCl 4 mL, 用 0.1 mol/L Na₂S₂O₃ 滴定至颜色将褪尽, 加质量浓度 0.5% 淀粉滴定至无色, 1 min 不变为终点。

1.4 NH₂-N 测定

采用甲醛法进行。取发酵液 1 mL, 用水稀释定容至 10 mL。吸取 2 mL 稀释液, 置入 100 mL 烧杯中, 加 80 mL 水, 搅拌下, 用 0.05 mol/L NaOH 滴定至 pH 8.20 (用酸度计测量), 此为游离酸度, 不予计量。加 10 mL 甲醛溶液(36%~38%), 立即用 0.05 mol/L NaOH 滴定至 pH 9.20 (用酸度计测定)。另取 80 mL 水, 不加发酵稀释液, 作空白液, 同上操作。计算氨态氮的含量, 计算公式为:

氨态氮(%) = (加甲醛后试液消耗 NaOH 溶液体积-加甲醛后空白液消耗 NaOH 溶液体积) × 0.05 × 0.014 01 × 10 × 0.5 × 100。

1.5 菌体生长测定

取菌悬液 1 mL, 用 0.1 mol/L HCl 稀释 10 倍, 于 721 型分光光度计上测定吸光值 A₆₆₀。

1.6 培养条件

GYP 斜面: 甘油 0.5%; 酵母膏 0.5%; 蛋白胨 0.3%; KH₂PO₄ 0.1%; MgSO₄·7H₂O 0.02%; 琼脂 1.8%; pH 7.2; 自来水配制 121 °C 30 min 灭菌。

种子培养基: 葡萄糖 1%; 玉米浆 2.5%; 酵母膏 0.1%; KH₂PO₄ 0.1%; MgSO₄·7H₂O 0.02%; CaCO₃ 2%; pH 7.2; 自来水配制 121 °C 30 min 灭菌。

发酵培养基: 葡萄糖 10%; 玉米浆 0.5%; 酵母膏 0.1%; KH₂PO₄ 0.1%; MgSO₄·7H₂O 0.05%; CaCO₃ 10%; pH 7.2; 自来水配制 105 °C 20 min 灭菌。

本实验无特别指明, 培养条件均为 28 °C, 180 r/min, 偏心距 4 cm 摇床培养, 500 mL 的三角瓶装培养液 50 mL。

2 结果

2.1 A6 菌株对不同氮源的利用

从表 1 可以看出, 菌株 A6 对无机氮和有机氮都能利用。相同含氮量的三种无机氮源中以 NaNO₃ 产酸量最高, 尿素次之。两种有机氮中, 以玉米浆为好。因此, 选用 NaNO₃ 和玉米浆作为细菌生产 2, 5-DKG 的氮源。

表 1 A6 菌株对不同氮源的利用

氮 源	OD _{460nm} (100×)	2, 5-DKG 产量(mg/mL)
0.1% 尿素(0.017 mol/L)	0.40	43.0
0.2% (NH ₄) ₂ SO ₄ (0.017 mol/L)	0.30	32.0
0.3% NaNO ₃ (0.034 mol/L)	0.78	83.5
1% 玉米浆	0.49	52.5
1% 酵母膏	0.18	19.5

注: 葡萄糖在培养基中质量浓度为 10%, 该表为摇瓶发酵 4 d 结果

2.2 种子培养基的调整

2.2.1 碳源的调整 表 2 为不同浓度的葡萄糖对 A6 菌株生长的影响, 可以看出, 葡萄糖的浓度对菌株生长影响不明显, 相对来说以质量浓度 3% 葡萄糖较好。

2.2.2 不同氮源对 A6 种子生长的影响 表 3 为不同氮源对 A6 菌体生长影响的实验结果。几种不同氮源对 A6 菌体生长影响并不很大, 菌液的 OD_{660nm} 都未超过 0.30 (稀释 10 倍), 相对来说以 1% 玉米浆配合使用 0.3% NaNO₃ 较好。

综合上述结果, A6 菌株的最佳种子培养条件是: 葡萄糖 3%, 玉米浆 1%, NaNO₃ 0.3%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄ 0.05%, 培养时间 24 h。

2.3 发酵条件的正交试验

2.3.1 因素位级安排 见表 4。

表 4 因素位级安排

因素	温度 (℃)	NaNO ₃ (%)	玉米浆 (%)	酵母膏 (%)	KH ₂ PO ₄ (%)	MgSO ₄ (%)	起始 pH	装量 (mL)
位级 1	28	0.1	0.5	0	0.05	0.05	5.5	50
位级 2	32	0.3	1.0	0.05	0.10	0.08	6.5	75
位级 3		0.5	1.5	0.10	0.15	0.12	7.5	100

2.3.2 正交试验结果 从正交试验结果可看出(表 5), 在 8 个因素中以 NaNO₃、通气量(即装量)、玉米浆和温度几个因素对 2, 5-DKG 的产量有较大影响, 其他因素对 2, 5-DKG 产量的影响不明显。NaNO₃ 以 0.1% 最好, 通气量选用 500 mL 的三角瓶装量 50 mL, 玉米浆以 0.5% 最好。温度 28 ℃为佳。

表 5 正交试验结果

因素	温度	NaNO ₃	玉米浆	酵母膏	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄	起始 pH	装量 mg/mL
位级 1 产量平均	57.11	70.58	62.50	51.75	50.92	51.83	48.33	66.83
位级 2 产量平均	31.00	39.58	42.25	38.50	38.83	44.00	45.67	39.92
位级 3 产量平均		22.00	27.42	41.92	42.42	36.33	38.17	25.42
极差	26.11	48.58	35.08	13.25	12.09	15.50	10.16	41.41

注: 正交试验采用 L₁₈(2¹×3⁷) 进行试验; 培养基中葡萄糖 105 ℃单独灭菌, 一次性加入使终浓度为 25%, CaCO₃ 10%

因此, 2, 5-DKG 产生菌 A6 的最佳发酵条件为: 葡萄糖 25%, NaNO₃ 0.1%, 玉米浆 0.5%, KH₂PO₄ 0.05%, MgSO₄ 0.05%, CaCO₃ 10%, pH 5.5, 500 mL 三角瓶装量 50

表 2 葡萄糖浓度对 A6 种子生长的影响

葡萄糖浓度(%)	OD _{660nm} (10×)
1	0.215
3	0.245
5	0.235

注: 3% 玉米浆为氮源, 摇瓶培养 24 h

表 3 不同氮源对 A6 种子生长的影响

氮源	OD _{660nm} (10×)
0.2% (NH ₄) ₂ SO ₄ (0.017 mol/L)	0.020
0.3% NaNO ₃ (0.034 mol/L)	0.095
0.1% 尿素(0.017 mol/L)	0.180
1% 玉米浆	0.245
1% 玉米浆+ 0.3% NaNO ₃	0.270
1% 玉米浆+ 0.2% (NH ₄) ₂ SO ₄	0.235
1% 玉米浆+ 0.1% 尿素	0.190

注: 葡萄糖 3%, 摇瓶培养 24 h

mL, 温度 28 ℃。

2.4 发酵过程监测

按照正交试验确定的最佳发酵条件, 我们对 A6 菌株的发酵过程进行了监测, 结果如表 6。

表 6 菌株 A6 在发酵过程中主要参数的变化

培养时间 (d)	pH	菌浓 (OD _{660nm})	葡萄糖 (mg/mL)	氨基氮 (mg/mL)	2, 5-DKG(钙盐)	
					OD _{460nm}	含量(mg/mL)
0	5.4	0	250.00	0.22	0	0
1	5.4	0.105	192.66	0.30	0.41(50×)	22.0
2	5.4	0.245	123.85	0.38	0.25(50×)	26.5
3	5.2	0.330	75.69	0.44	0.41(100×)	44.0
4	5.4	0.470		0.54	0.30(300×)	97.5
5	5.4	0.800		0.64	0.27(400×)	116.0
6	5.2	1.200		0.82	0.33(400×)	142.0
7	5.4	1.240		0.72	0.40(400×)	172.0
8	5.2	1.360		0.30	0.32(400×)	60.0

由表 6 可知, 培养基 pH 值由于 CaCO₃ 的作用, 基本没有什么变化。菌液浓度在开始时变化较慢, 从第 4 d 开始, OD_{660nm} 上升较快。葡萄糖变化较快, 在 3 d 之内, 便由 250.00 mg/mL 下降到 75.69 mg/mL。氨基酸的含量从发酵开始时即逐渐上升, 到第 6 d 达到最大值 0.82 mg/mL, 以后又迅速下降。2, 5-DKG(钙盐) 的含量开始时逐渐上升, 到第 7 d 时达到最大值 172.0 mg/mL, 以后又迅速下降。

从以上结果看, 在质量浓度 25% 葡萄糖的碳酸钙培养基中, 2, 5-DKG(钙盐) 的含量在第 7 d 最高, 浓度为 172.0 mg/mL, 转化率为摩尔比 52.05。

3 讨论

我们筛选得到的葡萄糖酸杆菌 A6 产生 2, 5-DKG(钙盐) 转化率为摩尔比 52.05, 可耐受质量浓度 25% 葡萄糖。菌株在耐糖性方面高于国内同类报道^[7], 这是本菌株的优点, 但发酵周期较长, 需 7 d。菌种活力不高, 种子生长慢, 培养 20 h 菌体浓度 OD_{660nm} 只有 0.30 (稀释 10 倍), 这可能是影响 2, 5-DKG 发酵周期, 限制其转化率的主要因素。因此, 为了提高 A6 菌株的转化率, 需要对菌株本身和发酵条件进行深入研究。

从 A6 菌株发酵过程中各主要参数的变化看, 存在的问题有: 残糖含量在前 3 d 能够测出, 到第 4 d 糖的含量开始上升说明该菌发酵 3 d 以后可能产生了胞外多糖, 从而影响了对残糖的测定, 因此, 残糖的测定方法有待于进一步的改进。氨基氮的含量在第 6 d 之前均处于上升的趋势, 说明该菌在这个时期能不断产生带有游离氨基的物质, 因此氨基氮的变化值得进一步探讨。

参考文献:

[1] 尹光琳, 陶增鑫, 于龙华, 等. L-山梨糖发酵产生维生素 C 前体——2-酮基-L-古龙酸的研究. iv. 菌种的

- 分离筛选和鉴定[J]. 微生物学报, 1980, 20(3): 246– 251.
- [2] 严自正, 陶增鑫, 于龙华, 等. L-山梨糖发酵产生维生素 C 前体——2-酮基-L-古龙酸的研究. ① 发酵条件的研究[J]. 微生物学报, 1981, 21(2): 185– 191.
- [3] 尹光琳. 维生素 C“基因工程菌”的构建和研究[J]. 工业微生物, 1991, (1): 29– 41.
- [4] Sonoyama T, Tani H, Matsuda K, *et al.* Production of 2-keto-L-gulonic acid from D-glucose by two-stage fermentation[J]. *Apply Environmental Microbiology*, 1982, 43(5): 1064– 1069.
- [5] Sonoyama T, Yagi S, Kageyama B. Facultatively anaerobic bacteria showing high productivities of 2, 5-diketo-D-gluconate from D-glucose[J]. *Agricultural Biological Chemistry*, 1988, 52(3): 667– 674.
- [6] Sulo P, Hudecova D, Properova A, *et al.* 2, 5-diketo-D-gluconate production by a mixed culture of two newly isolated strains: *Flavimonas oryzihabitans* and *Pseudomonas cepacia*[J]. *Biotechnology Letters*, 2001, 23: 693– 696.
- [7] 马志方, 董文玲, 王毅武, 等. 从 D-葡萄糖直接发酵产生维生素 C 前体——2-酮基-L-古龙酸. ② 2, 5-DKG 产生菌株发酵条件[J]. 微生物学通报, 1991, 18(4): 207– 211.
- [8] 韩雅珊. 食品化学实验指导[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1992. 14– 16.

Studies on Fermentation of 2, 5-diketø D-gluconate Producing Strain A6

SHI Gang¹, YAN Fang-gui², SONG Wei-ping¹

(1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Sciences, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100089, China; 2. Biology College, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Strain A6 (*Gluconobacter* sp.) which can convert D-glucose to 2, 5-diketø D-gluconate was obtained from fruit, vegetable and soil samples. Strain A6 accumulated 172. 0 mg of 2, 5-diketø D-gluconate calcium in 1 mL culture containing 25% D-glucose and 10% CaCO₃(W/V) after 7 days' cultivation at 28 °C, with a yield of 52. 05 mol%. The glucose tolerance of this strain exceeds that of other strains reported in China.

Key words: Strain; 2, 5-diketø D-gluconate; Yield; Glucose tolerance