

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*

尹光琳 林文楚 乔春红 叶 晴

(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:氧化葡萄糖酸杆菌(*Gluconobacter oxydans*)SCB329 以 D-山梨醇为底物培养时可产生微量 2-酮基-L-古龙酸;而葡萄糖酸杆菌(*Gluconobacter* sp.)SCB110 能将 D-山梨醇以较高效率转化为 L-山梨糖,但不产 2-酮基-L-古龙酸。将两种微生物在以山梨醇为底物的培养基中混合培养,其代谢产物经分离提纯后进行熔点测定、元素分析、红外吸收光谱测定等,确定其主要的代谢产物是 2-酮基-L-古龙酸。

关键词:氧化葡萄糖酸杆菌 SCB329, 葡萄糖酸杆菌 SCB110, D-山梨醇, 2-酮基-L-古龙酸, 混合培养

中图分类号:TQ920.1 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209(2001)06-0709-07

现有的维生素 C 生产方法为“莱氏法”工艺^[1]和我国在 1980 年发明的“二步发酵法”新工艺^[2]。目前,探索维生素 C 的微生物合成新途径的研究主要集中在构建基因工程菌,从 D-葡萄糖一步发酵产生 2-KLG、对 L-山梨糖途径的代谢工程研究和探索新的 D-山梨醇代谢途径等三个方面。新的 D-山梨醇代谢途径是指从 D-山梨醇直接发酵产生 2-KLG,代替了“莱氏法”中的酮化反应和化学氧化反应。早在六十年代法国首先申报了专利,1976 年日本专利也有过系统介绍^[3-6],最近的一项欧洲专利报道了葡萄糖酸杆菌属(*Gluconobacter* sp.)或醋酸杆菌属(*Acetobacter* sp.)某些菌株与某些能高效转化 L-山梨糖生成 2-KLG 的菌株能够有效地利用 D-山梨醇转化产生 2-KLG^[7]。1989 年,日本的 Sugisawa 等人对 *Gluconobacter melanogenus* IF03293 诱变株 Z84 能以 100g/L 的 D-山梨醇浓度生成 60g/L 2-酮基-L-古龙酸^[7]。

我们在完善“二步发酵法”新工艺和对氧化葡萄糖酸杆菌 AS1.945 进行不断研究的基础上,经过诱变筛选获得了一株性状更加优良的突变株 SCB329,它与多种细菌所搭配而成的组合菌系能利用 L-山梨糖大量产生 2-KLG^[8],如果有一株细菌能够将 D-山梨醇高效转化为 L-山梨糖,而 SCB329 又能转化 L-山梨糖为 2-KLG,将这二种微生物混合培养即可实现从 D-山梨醇一步生成 2-KLG(图 1)。我们按照这一思路进行了对 SCB329 和 SCB110 的混合培养研究。国内至今还未见有关研究从 D-山梨醇到 2-酮基-L-古龙酸这一代谢途径的相关报道。

* 国家自然科学基金资助项目(39970024)

作者简介:尹光琳(1939-),女,四川江津人,中国科学院上海生物工程研究中心研究员,博士生导师,主要从事微生物生理生化和维生素 C 产生菌分子生物学研究。

收稿日期:2000-10-27,修回日期:2001-02-26

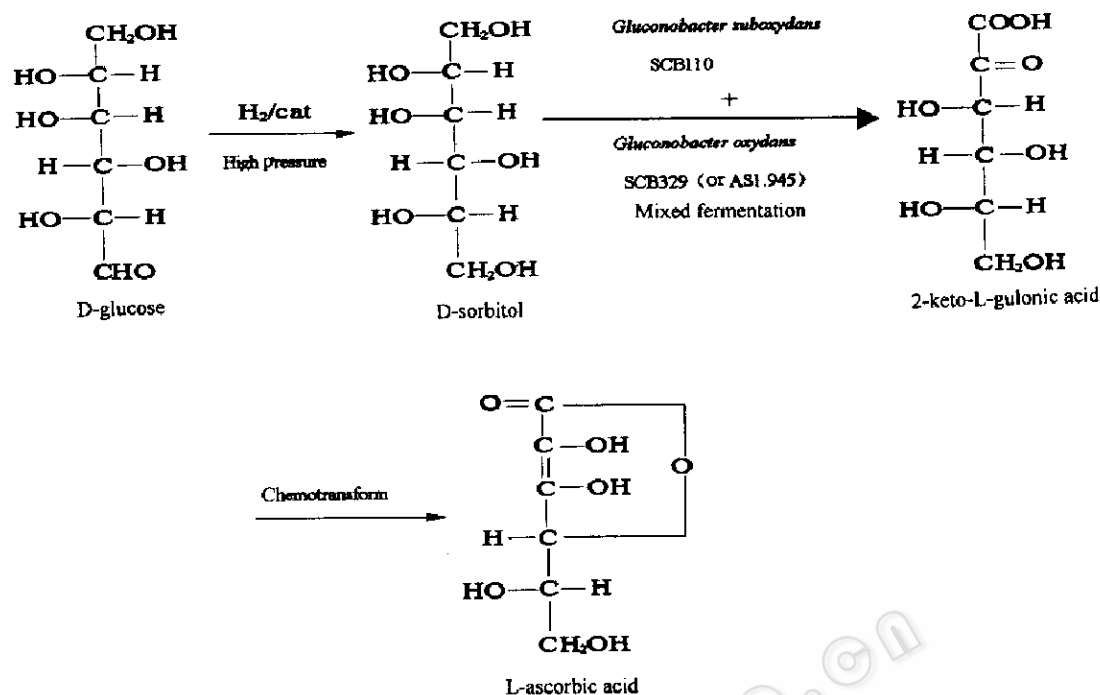


图 1 从 D-山梨醇生物合成维生素 C 的反应途径

Fig. 1 Biosynthesis routes of D-sorbitol to L-Ascorbic acid by different microorganisms

1 材料和方法

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

1.2.1 斜面培养基: (1) D-山梨醇-酵母膏培养基: D-山梨醇 20g, 酵母膏 3g, 蛋白胨 10g, 尿素 1g, KH_2PO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02g, CaCO_3 1g, 琼脂 20g, pH7.0, 用自来水定容至 1L, 121°C (1.03×10^6 Pa) 20min 灭菌。 (2) *Gluconobacter oxydans* SCB329 培养用 L-山梨糖固体培养基: L-山梨糖 15g, 玉米浆 3g, 蛋白胨 10g, CaCO_3 4g, 酵母提取物 3g, 尿素 4g, KH_2PO_4 5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, 琼脂 20g, pH6.8 ~ 7.0, 用自来水定容至 1L, 112°C (0.55×10^5 Pa) 30min 灭菌。

1.2.2 种子培养基: 即 D-山梨醇-酵母膏液体培养基, 组成同上。

1.2.3 发酵培养基: D-山梨醇 80g, 玉米浆 10g, 尿素 15g (分消), KH_2PO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g, CaCO_3 6g, pH7.0, 用自来水定容至 1L, 121°C (1.03×10^6 Pa) 20min 灭菌。

1.3 培养条件

1.3.1 单一菌株的种子培养和摇瓶发酵: (1) *Gluconobacter* sp. SCB110: 在 D-山梨醇-酵母膏平板培养基上划线后置于 28°C 培养 24 h, 从新鲜斜面上挑取单菌落, 接入种子培养基 (25mL/250mL 瓶), 30°C 往复式摇床 (220r/min) 培养 16 ~ 24 h。以 1:10 的接种量比接种到发酵培养基中 (50mL/500mL 瓶), 置于往复式摇床 (220r/min) 上 30°C 发酵 96 h。取下摇瓶

用蒸馏水补足体积并分别进行产酸、产糖和残余 D-山梨糖醇分析。(2) *Gluconobacter oxydans* SCB329:先在新鲜的 L-山梨糖平板培养基上划线并在 28℃ 培养 36~40 h,直至获得单菌落为止。挑取单菌落转接至新鲜斜面上,28℃ 培养 36~40 h。将长出的菌苔用少量无菌水洗下,接入另一瓶种子培养基(25mL/250mL 瓶)中,28℃ 往复式摇床(220r/min)培养 16~24 h。同样以 1:10 的接种量比接种到发酵培养基中,往复式摇床(220r/min)上 30℃ 发酵 96 h。取下摇瓶用蒸馏水补足体积并分别测定产酸、产糖和残醇分析。

1.3.2 *Gluconobacter* sp. SCB110 和 *Gluconobacter oxydans* SCB329 的混合培养发酵:以 1:10 的总接种量,而 SCB110 种液和 SCB329 种液为 4:1(V/V)的比例接入同一发酵培养基(50mL/500mL 瓶)中,往复式摇床(220r/min)上 30℃ 混合发酵 96 h。取下摇瓶用蒸馏水补足体积 50mL 后进行产物分析。

1.4 分析方法

1.4.1 产物的定性测定:采用纸层析法定性鉴别^[2],同时用高压液相层析法进行定性和定量测定^[9,10]。将发酵液进行絮凝处理和离心后,取上清液 20~100μL 上样。Bio-Rad A-27 树脂填充柱(4.6mm × 250mm),45℃,HPLC 流动相为 0.1mol/L 甲酸铵(pH3.2),流速 1.0mL/min。

1.4.2 2-酮基-L-古龙酸(2-KLG)和 L-山梨糖含量测定:按文献^[2,6,8]的方法进行。

1.4.3 发酵液中残余 D-山梨醇分析:采用改进的薄层分析法检测。取硅藻土用 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液(pH5.0)制成薄板,同时将稀释的样品与标准品分别点样,用丙酮-正丁醇展开剂展层约 20 分钟。待展开前沿至薄板上缘 2mm 时,取出烘干,用 0.3% 高锰酸钾溶液显色剂向薄板喷雾,并在氨气中熏 1~2min。从薄板所显出明显的色斑即可对残醇进行定性分析。

1.4.4 发酵液中 2-酮基-L-古龙酸提取:将加入絮凝剂沉降离心后的上清液将 pH 调低到 2.5~3.0 后用 732^[11] 型阳离子交换树脂处理,收集 pH < 2.0 交换液减压浓缩,抽滤脱水干燥后即可得到白色粉末状的 2-酮基-L-古龙酸结晶^[2,8]。

2 结果和讨论

2.1 *Gluconobacter* sp. SCB110 和 *Gluconobacter oxydans* SCB329 的生物学特征

2.1.1 *Gluconobacter* sp. SCB110 的培养和生理生化特征:将本实验室保存以及购买、收集的能使 D-山梨醇转化成 L-山梨糖的若干株细菌,先按照上述的培养基和培养条件进行种子培养和摇瓶发酵,并用纸层析法鉴别是否能利用 D-山梨醇产生 2-KLG;在几乎不产酸或产量极微的情况下,再选取转化生成 L-山梨糖量较高的菌株与 *Gluconobacter oxydans* SCB329 进行混合培养和产物的鉴别与检测。经过不断选育和驯化,终于获得了一株较好的搭配菌株 *Gluconobacter* sp. SCB110。

形态特征:细胞呈长杆状,单个、成对或成短链排列。革兰氏染色阴性,无芽孢。28℃ 培养 3d 后其菌落直径约 0.2mm,浅灰白色至微黄色菌落呈圆形,表面凸起有光泽并略带透明,无内核(图 2)。

生理生化特征:实验证明,菌株对氨苄(Amp)和氯霉素(Cm)抗性(50mg/mL),对卡那霉素(Kan)和四环素(Tc)敏感。在 D-葡萄糖-CaCO₃ 培养基上形成少量的淡黄色水溶性色

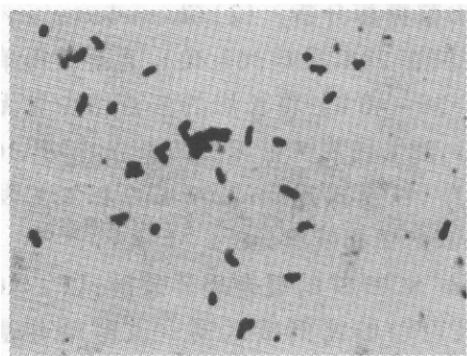


图2 *Gluconobacter* sp. SCB110 细胞形态
($\times 1000$)

Fig.2 The morphology of *Gluconobacter* sp. SCB110
cells ($\times 1000$)

素。可氧化 D-葡萄糖产生较多的 5-酮基-D-葡萄糖酸钙(盐)。可从聚乙醇产生酮。最适 pH 为 6.8 ~ 7.0, 生长温度以 28℃ ~ 30℃ 为宜。

因其主要特征与葡萄糖酸杆菌相似, 参照伯杰氏细菌鉴定手册(第八、九版), 仍定名为葡萄糖酸杆菌属细菌(*Gluconobacter* sp.)^[11,12]。

2.1.2 *Gluconobacter oxydans* SCB329 的菌株和生理生化特征^[15]:形态特征: *Gluconobacter oxydans* SCB329 菌株的细胞呈卵圆至短杆状, 革兰氏染色阴性, 无芽孢。28℃ 培养 2d 后细胞大小为 (0.5 ~ 0.8) $\mu\text{m} \times (1.0 \sim 1.2) \mu\text{m}$, 单个、成对或成短链排列。菌落无色透明呈圆点状, 表面凸起有光泽, 边缘整齐。

生理生化特征: 接触酶阳性。在 pH4.5 时生长并能

氧化乙醇为乙酸。氧化 D-葡萄糖产生 D-葡萄糖酸和 2-酮基-D-葡萄糖酸; 具有聚乙醇的生酮作用。DNA 的 (G + C) mol% 含量为 57.8。最适 pH 为 6.5 ~ 6.8, 生长温度以 25℃ ~ 30℃ 为宜。对链霉素(Str)敏感。

2.2 *Gluconobacter* sp. SCB110 和 *G. oxydans* SCB329 混合发酵产物检测

2.2.1 *Gluconobacter* sp. SCB110 对 D-山梨醇的转化: (1) *Gluconobacter* sp. SCB110 将 D-山梨醇转化生成 L-山梨糖: 对 SCB110D-山梨醇发酵液用纸层析法鉴别, 从显色结果可见, 与 L-山梨糖标准品的 R_f 值相同位置处有深棕色斑点, 采用改进的甘油铜法测定发酵液中转化 D-山梨醇所生成的 L-山梨糖含量, 其转化率为 85 mol% 左右。 (2) 用改进的薄层分析法检测 *Gluconobacter* sp. SCB110 发酵液中残余的 D-山梨醇: 与标准品相比, 可观察到极少量 D-山梨醇斑点, 说明残存量很低。 (3) *Gluconobacter* sp. SCB110 发酵液中 2-酮基-L-古龙酸含量测定: 用纸层析法和改进的碘量法均未检测到 2-KLG(表 1); 用 HPLC 法检测结果如图 3-B 所示。与标准品(图 3-A)相比, SCB110 在 27min 和 30min 左右均无峰形出现, 表明了单独的 SCB110 发酵液中既不产生 2-KDG, 也不产生 2-KLG。

2.2.2 *G. oxydans* SCB329 对 D-山梨醇的转化: (1) *G. oxydans* SCB329 发酵液中 L-山梨糖的生成: 从纸层析的显色结果可见, 产物的 R_f 值与 L-山梨糖标准品的 R_f 值相同, 但采用甘油铜法则无法测出所生成的 L-山梨糖含量。表明发酵液中仅含有少量的 L-山梨糖。 (2) 用改进的薄层分析法检测 *G. oxydans* SCB329 发酵液中残余的 D-山梨醇: 与标准品相比, 可观察到较大量 D-山梨醇斑点。 (3) *G. oxydans* SCB329 发酵液中 2-酮基-L-古龙酸含量测定: 用纸层析法鉴别确定了发酵产物为 2-KLG; 从改进碘量法的测定结果表明了其中含有少量 2-KLG(表 1), 对 D-山梨醇的转化率约为 3.51% ~ 3.64 mol. %。用 HPLC 法所检测的结果与碘量法测定相一致(图 3 - C)。

2.2.3 *Gluconobacter* sp. SCB110 和 *G. oxydans* SCB329 混合发酵产物中 2-酮基-L-古龙酸含量的测定: 用纸层析法鉴别结果可以确定发酵产物为 2-KLG; 采用改进碘量法测定的结果表明了发酵液中含有大量的 2-KLG(表 1)。用 HPLC 法检测的结果如图 3 ~ D 所示。与标准品(图 3 - A)相比, 在 30min 左右有一较明显的峰形出现, 表明了 SCB110 和 SCB329 混合

发酵产物中确实产生了一定量的 2-KLG。

表 1 在 D-山梨醇培养液中 2-酮基-L-古龙酸的生成

Table 1 Production of 2-KLG in D-Sorbitol broth

Sample	SCB110 alone		SCB329 alone		Mixed culture of SCB 110 and SCB329		
2-KLG/(mg/mL)	0	0	2.99	3.10	64.79	59.72	61.80
Yield of D-Sorbitol to 2-KLG/(mol%)	0	0	3.51	3.64	76.00	70.05	72.49

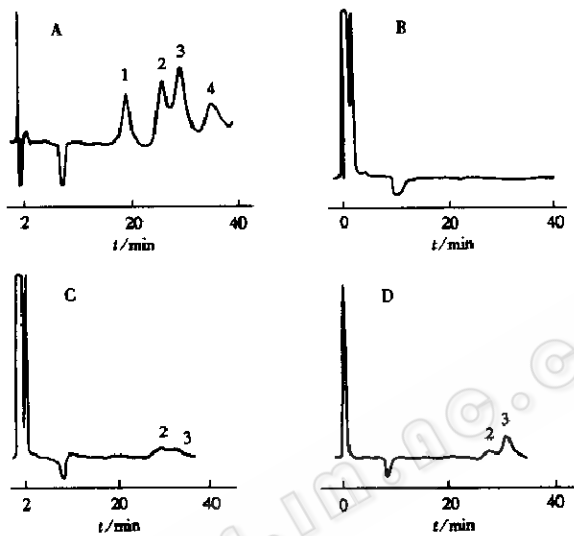


图 3 发酵液中 2-酮基-L-古龙酸高效液相色谱

Fig.3 Chromatography of 2-KLG in culture broth A.5-KDG;B.2-KDG;C.2-KLG;D.2,5-DKG.

A.The standard sample;B.The fermentation product of SCB110;C.The fermentation product of SCB329;D.The mixed fermentation product of SCB110 + SCB329.

2.3 *Glunocobacter* sp.SCB110 和 *G. oxydans* SCB329 混合发酵产物的鉴定

将 *Glunocobacter* sp.SCB110 和 *G. oxydans* SCB329 的混合发酵产物按前述方法分离和提取 2-酮基-L-古龙酸,获得了白色粉末状 2-酮基-L-古龙酸结晶。经纸层析法定性鉴别无误后,即可进行产物鉴定。

2.3.1 红外吸收光谱测定:经测定结果,所分离提取的 2-酮基-L-古龙酸产物的吸收峰与标准品相一致(图 4)。

2.3.2 元素分析:所获得的 2-酮基-L-古龙酸产品,经元素分析,计算值及标准样品测定值相符(表 2)。

表 2 SCB110 和 SCB329 混合发酵液提取产物元素分析

Table 2 The Elementary analyses of the 2-KLG products by mixed culture

Sample	C/ %		H/ %	
The fermentation product of 2-KLG	33.85	33.85	5.78	5.85
Calculation for C ₆ H ₁₀ O ₇ ·H ₂ O	33.97		5.66	
The Standard Sample	34.12	34.09	5.62	5.64

2.3.3 熔点测定:发酵液中所分离提取的 2-酮基-L-古龙酸产物熔点值为 170℃ ~ 171℃,与标准品相同。

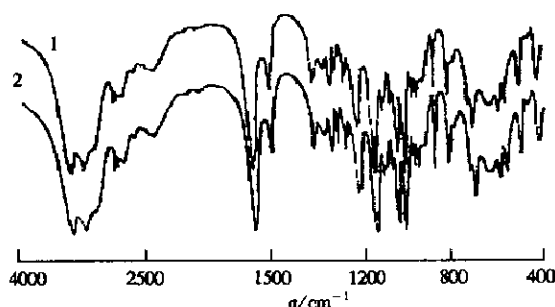


图4 2-酮基-L-古龙酸红外吸收光谱(KBr)

Fig.4 Infrared absorption spectrum of 2-KLG(KBr)

1. The standard sample; 2. Mixed fermentation product of Strain SCB110 + Strain SCB329.

根据上述产物鉴定结果,证实了 *Glunocobacter* sp. SCB110 和 *G. oxydans* SCB329 利用 D-山梨醇进行混合培养发酵,所生成的代谢产物确系 2-酮基-L-古龙酸。

3 结论和展望

我们分别研究了 *Glunocobacter* sp. SCB110 和 *G. oxydans* SCB329 以 D-山梨醇为底物的单独培养和两株菌混合培养及摇瓶发酵条件。实验结果表明, *Glunocobacter* sp. SCB110 单独培养时不产生 2-KLG,但能将 D-山梨醇以较高的转化率转化为 L-山梨糖。

G. oxydans SCB329 在以 D-山梨醇作为底物单独培养时其发酵液中仅含有少量的 2-KLG,生成 L-山梨糖的含量也很少,但它具有将 L-山梨糖高效转化为 2-KLG 的特性^[15]。 *Glunocobacter* sp. SCB110 和 *G. oxydans* SCB329 混合培养可将 D-山梨醇高效转化为 2-KLG。在发酵过程中我们还注意到,如果 *Glunocobacter* sp. SCB110 和 *G. oxydans* SCB329 混合发酵时如果种液搭配不合适,发酵产物中则可能少量生成副产物 2-酮基-D-葡萄糖酸(2-KDG),掌握好两株菌的比例是获得最佳产物的关键之一。经过对培养和发酵条件的初步优化,采用摇瓶发酵所产生的 2-酮基-L-古龙酸,最高产量可以达到 60mg/mL 以上。

D-山梨醇是一种比 L-山梨糖更便宜和更容易得到的碳源,如果能从 D-山梨醇直接发酵产生 2-KLG,对“莱氏法”工艺将是很大的改进,必将大大简化工艺,降低成本。具有明显的现实意义和潜在的应用价值。这项研究对于探索维生素 C 微生物合成新途径的和发展维生素 C 工业化生产都是有价值和值得继续研究的。

致谢 元素分析和红外光谱由中国科学院上海有机化学研究所代测,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Reichstein T, Grussner A. *Helv Chim Acta*, 1934, **17**: 311 ~ 328.
- [2] 尹光琳,陶增鑫,严自正,等.微生物学报,1980, **20**(3): 246 ~ 251.
- [3] Grindley J F, Paton M A, Pol. H A, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**: 1770 ~ 1775.
- [4] 尹光琳.生物工程学报,1986, **2**(4): 17 ~ 21.
- [5] Sonoyama T, Kageyama B, Yagi S, et al. *Agric Biol Chem.*, 1987, **51**(11): 3039 ~ 3047.
- [6] Sugisawa T, Hoshino T, Fujiwara A, et al. *Agric Biol Chem*, 1990, **54**(5): 1201 ~ 1209.
- [7] Hoshino T, Ojima S, Sugisawa T. European patent, 1992, 0,518,136, A2.
- [8] 尹光琳,何建明,任双喜,等.工业微生物,1997, **27**: (1), 1 ~ 7.
- [9] Robert A L, Jana L S. *Analytical Biochemistry*, 1986, **157**: 360 ~ 366.
- [10] 乔春红,尹光琳.现代科学仪器,2000, **71**(4): 18 ~ 19.
- [11] R.E. 布坎南, N.E. 吉本斯等编.伯杰氏细菌鉴定手册.第八版,北京:科学出版社,1984. 325 ~ 328.
- [12] Kreig N R, Holt J G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. I, Baltimore/London: Williams & Wilkins Press, 1984, 275 ~ 278.

PRODUCTION OF VITAMIN C PRECURSOR——2-KETO-L-GULONIC ACID FROM D-SORBITOL BY MIXED CULTURE OF MICROORGANISMS*

Yin Guanglin Lin Wenchu Qiao Chunhong Ye Qing

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

Abstract: *Gluconobacter oxydans* SCB329 only produce a little amount of 2-Keto-L-gulonic acid (2-KLG) from D-Sorbitol when growing alone; while *Gluconobacter* sp. SCB110 can transform D-Sorbitol to L-Sorbose and can not produce 2-KLG. 2-Keto-L-gulonic acid, the precursor of L-Ascorbic acid (Vitamin C) synthesis, was prepared directly with a high efficiency from D-Sorbitol by mixed culture of microorganism, which comprised *Gluconobacter* sp. SCB110 and *Gluconobacter oxydans* SCB329. The fermentation product from the mixed culture broth in the D-Sorbitol-containing medium was identified as 2-Keto-L-gulonic acid by HPLC, elementary analysis and infra-red adsorption spectrum.

Key words: *Gluconobacter oxydans* SCB329, *Gluconobacter* sp. SCB110, D-Sorbitol, 2-Keto-L-gulonic acid (2-KLG), Mixed culture