

L-山梨糖发酵产生维生素C前体 ——2-酮基-L-古龙酸的研究

I. 菌种的分离筛选和鉴定

尹光琳 陶增鑫 于龙华 王大帮 谈家林 严自正

(中国科学院微生物研究所, 北京)

宁文珠 王长会 王书鼎 姜慧凤

张秀明 冯晓云 赵强 魏文巧

(北京制药厂, 北京)

在以L-山梨糖为碳源的培养基中用富集培养法, 从670个试样中分离得到1,615株利用L-山梨糖的细菌, 从中选出了一株由L-山梨糖产生维生素C前体——2-酮基-L-古龙酸的优良菌株N 1197 A。后来证实该菌株是包括大、小两种菌落菌株的混合菌株。

对两种菌分别进行了鉴定。按照Bergey手册, 其中大菌落菌株属条纹假单胞杆菌(*Pseudomonas striata*); 小菌落菌株属氧化葡萄糖酸杆菌(*Gluconobacter oxydans*)。

发酵液经H⁺型732强酸性阳离子交换树脂处理, 再经减压浓缩后得到白色结晶。经纸层析、元素分析和转化生成维生素C后的红外吸收光谱等项鉴定, 证明N 1197 A菌株由L-山梨糖发酵所得产品确系2-酮基-L-古龙酸。

维生素C是人体营养必需的维生素, 在医药和食品上均有重要用途。2-酮基-L-古龙酸是合成维生素C的前体。1933年, Reichstein等由D-山梨醇化学合成维生素C获得成功, 以后国内外均沿用此法进行生产^[1,2]。由于反应步骤多, 连续操作亦有困难, 因此有必要寻找一种更有效的生产途径。二步发酵法则是以D-山梨醇经第一步发酵所得之L-山梨糖再进行第二步发酵生成2-酮基-L-古龙酸, 再经转化即可得到维生素C。

国外, 以L-山梨糖为原料利用微生物氧化生成2-酮基-L-古龙酸以制取维生素C的研究已有过报道。1962年Huang^[3]首

先发现假单胞杆菌属(*Pseudomonas*)的某些种具有这种氧化能力, 此后一些研究者^[4,5]发现了不少种类的细菌, 如假单胞杆菌属(*Pseudomonas*), 葡萄糖酸杆菌属(*Gluconobacter*), 沙雷氏菌属(*Serratia*), 芽孢杆菌

本文于1980年2月24日收到。

分离筛选于1960年2月至1970年8月在北京制药厂进行。菌种鉴定于1971年、1974年和1978年先后在中国科学院微生物研究所进行。

微生物研究所曹桂芳和洪俊华同志参加了菌种鉴定工作。曾参加过部分工作的还有: 微生物研究所徐婉学、徐浩、梁改芹、李逢英; 北京制药厂于洪田、宋慧玲、赵硕经; 北京医药工业研究院应雪琦和任桂兰等同志, 特此致谢。

元素分析和红外光谱由中国医学科学院药物研究所分析化学室代测; X-射线衍射分析由中国科学院物理研究所十室代测, 特此致谢。

属 (*Bacillus*) 和克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*) 中的某些种均能起转化作用, 但产生 2-酮基-L-古龙酸的能力都极低, 迄今未见正式工业生产的任何报道。过去国内没有这方面的研究。

本文着重报道氧化 L-山梨糖生成 2-酮基-L-古龙酸的菌种的分离筛选和鉴定。

材料和方法

(一) 菌种的分离和筛选

1. 菌种

采自工厂、农田和城市街道等处的土样、污水以及干、鲜果品样共 670 份, 分离出菌株 4,580 株。另有中国科学院微生物研究所保藏菌种 747 株。

2. 培养基

(1) 合成培养基(克): L-山梨糖 30, NH_4NO_3 1, K_2HPO_4 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, 自来水 1 升, pH7.0, 8 磅 30 分钟灭菌。

(2) 种子培养基(克): L-山梨糖 10、牛肉膏 3、蛋白胨 10、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2, 自来水 1 升, pH 7.0, 8 磅 30 分钟灭菌。

(3) 发酵培养基(克): L-山梨糖 70, 酵母膏 1, K_2HPO_4 0.7, KH_2PO_4 0.3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, 甘油 2, CaCO_3 5, 自来水 1 升, pH7.0, 8 磅 30 分钟灭菌。

3. 分离方法

先用合成培养基进行富集培养, 在 28—30°C 振荡培养 1—2 天, 平板划线分离, 挑取单菌落, 转接到牛肉汁斜面培养基上保存。

4. 筛选方法

菌种筛选是用 200 毫升三角瓶加入 20 毫升种子培养基, 振荡培养 1—2 天。摇瓶试验在 500 毫升三角瓶内 (盛有 50 毫升发酵培养基) 进行。用培养 18 小时左右的种子液接种, 接种量为 10%, 28—30°C 振荡培养 6 天。往复式摇床振速为 110 次/分, 振幅 7 厘米。用纸层析法检出 2-酮基-L-古龙酸, 选留产酸较高菌株。

(二) 分析方法

1. 用国产精密 pH 试纸测定 pH。

2. 发酵液中 2-酮基-L-古龙酸的定性测定, 参照 Okazaki 等人^[3,6]的方法修改后用纸层析法进行。用圆形中速滤纸(直径 15 厘米), 将培养 6

天的发酵液离心后取上清液点样, 点于滤纸圆心外 1 公分处; 展开剂为丁酮:正丙醇:甲醇:3% 氨水为 3:1:1:1 (V/V), 以放射法展开。展层后用 0.2% 邻苯二胺盐酸盐的乙醇溶液显色。为了鉴别 2-酮基-D-葡萄糖酸, 可用苯酚-醋酸铵缓冲液 (pH 5.0—5.3) 作为展开剂, 用量比为 1:2 (W/V), 下行法分离后再显色。

用比色法进行定量测定^[7]。

结果和讨论

一、产生 2-酮基-L-古龙酸菌种的筛选

将分离得到的 4,580 株细菌和微生物所保藏的细菌 747 株进行筛选, 得到可利用 L-山梨糖的细菌共 1,615 株; 从中用纸层析法筛选产酸菌株。凡是酸点的 R_f 值和标准 2-酮基-L-古龙酸的 R_f 值相一致的菌株, 再进行复筛。经过反复筛选, 得到 3 株能利用 L-山梨糖产生 2-酮基-L-古龙酸且产酸量均在 1 毫克/毫升以上的菌株 (P 1.50, N 1183 C 和 N 1197 A), 其中 N 1197 A 菌株产酸量最高。从纸层析结果 (图 1) 可以看出发酵产物单一, 经测定摇瓶发酵产酸量可达到 10 毫克/毫升左右。



图 1 N1197A 发酵液纸层析

二、N1197A 发酵液中 2-酮基-L-古

龙酸的提取和鉴别

1. 2-酮基-L-古龙酸的提取

发酵液 $\xrightarrow{[H^+]型^{732}阳离子交换树脂柱}$ 酸性交换液

液 (pH \approx 2.0) $\xrightarrow{\text{加入 0.5\% 酸性白陶土 及 0.2\% 活性炭, 搅拌}}$ 过滤 \rightarrow 上清液

清液 $\xrightarrow{\text{加热至 90-95}^\circ\text{C}}$ 静止 \rightarrow 上清液

液 $\xrightarrow{[OH^-]型 701 阴离子交换树脂柱}$ 稀氨水

洗脱 $\xrightarrow{[H^+]型 732 阳离子交换树脂柱}$ 交换液

减压浓缩 $\xrightarrow{\text{冷却结晶}}$ 浓缩液 $\xrightarrow{\text{脱水}}$ 2-酮基-L-古龙酸白色结晶

(真空度 700 托, 45 $^\circ\text{C}$ 以下)

2. 2-酮基-L-古龙酸的鉴别

- (1) 纸层析: 展层显色后发酵液斑点的 R_f 值与标准样品位置相同(图 1)。
- (2) 元素分析: 按 $C_6H_{10}O_7$ 的计算理论值: C 37.12, H 5.19。发酵产物的测定值: C 32.53, 32.76; H 5.31, 5.21。结果和计算值基本相符。

3. 为了进一步对发酵产物进行鉴别, 我们将 N 1197 A 发酵生成的 2-酮基-L-古龙酸转化成维生素 C 与化学合成法大生产所得到的维生素 C 及标准样品作了如下比较:

- (1) 熔点测定: N 1197 A 发酵产物转化所得的维生素 C 的熔点为 191.2 $^\circ\text{C}$, 结果与标准样品相符。

(2) 红外吸收光谱: 吸收峰与化学合成法大生产所得维生素 C 的吸收峰相符(图 2)。

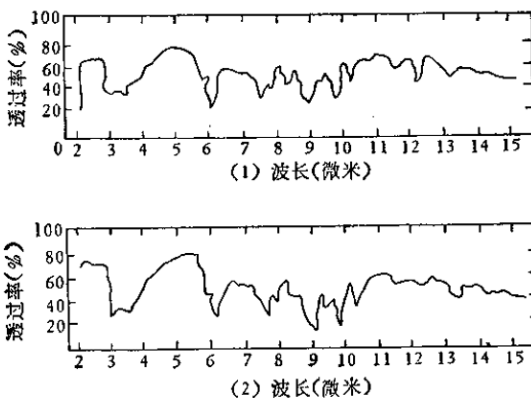
(3) X-射线衍射分析: 应用魏森堡(Weissenburg)单晶照相机对 N 1197 A 发酵产物与化学合成法大生产转化所得的维生素 C 重结晶样品拍摄了周转衍射图(b 方向与 c 方向), 二者的衍射谱与结晶学参数相同, 并与标准样品数据吻合。

(4) 按中国药典 1963 年要求, 对 N 1197 A 发酵产物转化得到的维生素 C 进行了常规分析: 比旋度(+20.5 $^\circ$ —+21.5 $^\circ$), 灼烧残渣(0.03%), 重金属铁盐及澄明度等均符合规定标准。 $C_6H_8O_6 = 99.95\%$ 。

根据分析鉴定的结果, 和标准样品相符。因此, N 1197 A 菌株以 L-山梨糖为原料, 发酵提取得到的结晶产物, 确系维生素 C 前体——2-酮基-L-古龙酸。

三、产酸菌株 N 1197 A 的鉴定

我们在用 N 1197 A 菌株进行发酵条件试验过程中, 从平皿中见到有颜色与外观极为接近而大小明显不同的两种菌落(图 3), 并证实只有两种菌在一起混合培养时, 才能正常产酸¹⁾。我们将大小两种菌分离纯化后分别进行了微生物学特性的研究。



(1) 大生产产品 (2) 二步发酵产品
图 2 维生素 C 红外光谱

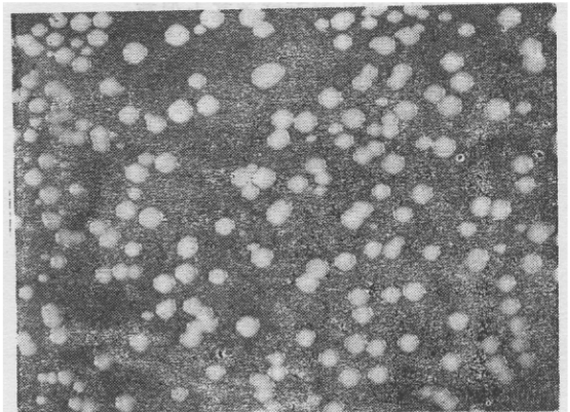


图 3 N 1197 A 菌株的菌落形态

1) 关于大小两种菌相互关系的证实不在本文讨论。

1. 大菌落菌株的鉴定

N 1197 A 大菌落细胞杆状,端圆,革兰氏染色阴性,无芽孢,单个或成对排列。 $0.4 \times 1.0 - 1.8$ 微米,端生单鞭毛(图 4)。肉汁斜面上菌苔光滑,具紫色荧光,不液化明胶,氧化葡萄糖。不产生吲哚,还原硝酸盐为亚硝酸盐。 37°C 生长良好, 42°C 不生长。牛奶产碱,并使石蕊还原。

按照 Bergey 细菌鉴定手册第七版^[8],根据上述各种性状,大菌落菌株被鉴定为条纹假单胞杆菌 (*Pseudomonas striata*)。

2. 小菌落菌株的鉴定

(1) 形态特征:细胞椭圆至短杆状,革兰氏染色阴性,无芽孢。 30°C 培养二天后

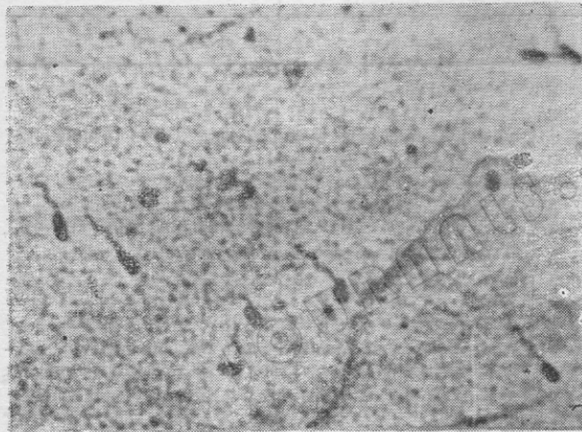


图 4 条纹假单胞杆菌 (*Pseudomonas striata*)
N 1197 A 大菌细胞形态($\times 900$)

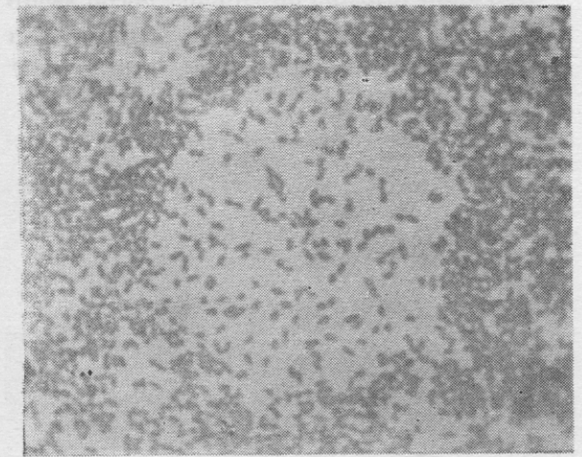


图 5 氧化葡萄糖酸杆菌 (*Gluconobacter Oxydans*)
N 1197 A 小菌细胞形态($\times 1,500$)

大小为 $0.5 - 0.7 \times 0.6 - 1.2$ 微米,单个或成对排列(图 5)。在葡萄糖培养基上生长极微弱,甘露醇培养基上生长良好。菌落呈圆点状,表面微突起,边缘整齐,无色透明。在 10% 蔗糖加碳酸钙斜面培养基上产生浅褐色水溶性色素。畸形细胞罕见。

(2) 生理生化特征:在 pH 4.5 时生长并能氧化乙醇产生乙酸。具有多醇生酮作用,在甘油中更为明显。并有生成 γ -吡喃酮活性。接触酶反应阳性,不产生多糖。生长温度以 $25^{\circ}\text{C} - 30^{\circ}\text{C}$ 为宜。在 37°C 条件下开始未见生长,培养一周后方微弱生长。由于它在不以 L-山梨糖为碳源的培养基上生长差,鉴定中观察均较微弱。凡属阴性结果时都再次补种以确定菌株是否生长。

(3) 小菌落菌株的定名:鉴于假单胞杆菌属 (*Pseudomonas*),醋酸杆菌属 (*Acetobacter*) 和葡萄糖酸杆菌属 (*Gluconobacter*) 在形态和生理特征上有许多共同点,往往难于区分。在 Bergey 手册第八版^[9]中,将这三个属的区别特征归纳列表。我们在鉴定小菌落的同时,并选用中国科学院微生物研究所保藏组的菌株 AS 1.508 和 AS 1.1003 作为对照以资比较,现将结果同时列入表 1。

由表 1 可见,葡萄糖酸杆菌属菌株一般应具有产生 5-酮基-葡萄糖酸结晶的活性。按 Bergey 手册第八版记载,此种能力在菌种移接多代后可能失去,尤其生黑亚种更为容易。N 1197 A 中小菌落从 1970 年分离到 1978 年鉴定已移接无数代,过去不曾测定有否产生此种结晶,由于其他形态及生理生化特征均一致,可以推测原来具有这种能力而在无数代移接后已失掉。

表 1 葡萄糖酸杆菌属、醋酸杆菌属和假单胞杆菌属的区别特征

	葡萄糖酸杆菌属		醋酸杆菌属		假单胞杆菌属	
	Bergey 手册 归纳特征	N 1197 A 小 菌	Bergey 手册 归纳特征	AS 1.508	Bergey 手册 归纳特征	AS1.1003
鞭毛着生	端毛或无	无	周毛或无	无	端毛	端毛
在 pH4.5 生长	+	+	+	+	-	-
氧化作用:						
pH4.5 时乙醇→乙酸	+(中等)	+(较弱)	+(强)	+(强)	-	-
乙酸→CO ₂	-	-	+	+	不定	-
乳酸→CO ₂	-	-	+	+	不定	-
葡萄糖→葡萄糖酸	+	+	不定	+	不定	+
用静息细胞氧化氨基酸	-	-	+	+	+	+
三羧酸循环	-	-	+	+	+	+
5-酮基-葡萄糖酸生成	+	-	不定	-	-	-
多醇生酮作用	+	+	不定	-	-	-
灰绿色或荧光色素	-	-	-	-	不定	+

根据以上特征,按 Bergey 手册第八版^[9],小菌落菌株被鉴定为氧化葡萄糖酸杆菌 (*Gluconobacter oxydans*)。

参 考 文 献

- [1] Reichstein, G.: *Helv. Chim. Acta*, 16, 1019, 1933.
- [2] Grey, B. E.: US Patent 2421, 611, 1947.
- [3] Huang, H. T.: US Patent 3043, 749, 1962.
- [4] Takeda Chemical Industries Ltd.: Fr. Patent 1, 376, 741, Co7e-C1 2k, 1964.
- [5] Okazaki, H. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 32: 424—431, 1968.
- [6] Okazaki, H. et al.: *ibid.* 32: 1250, 1968.
- [7] Somogy, M.: *J. Biol. Chem.*, 195: 19—23, 1952.
- [8] Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th ed., London, 1957, p. 88.
- [9] Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., Williams and Wilkins Company/Baltimore, 1974, p. 217, 251, 276.

STUDIES ON THE PRODUCTION OF VITAMIN C PRECURSOR —2-KETO-L-GULONIC ACID FROM L-SORBOSE BY FERMENTATION

I. ISOLATION, SCREENING AND IDENTIFICATION OF 2-KETO-L-GULONIC ACID PRODUCING BACTERIA

Yin Guang-lin Tao Zeng-xin

Yu Long-hua Wang Da-si

Dan Jia-lin Yan Zi-zheng

(*Institute of Microbiology, Academic Sinica, Beijing*)

Ning Wen-zhu Wang Chang-hui

Wang Shu-ding Jiang Hui-feng

Zhang Xiu-ming Feng Xiao-yun

Zhao Qiang Wei Wen-qiao

(*Beijing Pharmaceutical Factory*)

1615 strains of L-sorbose-utilizing bacteria were isolated from 670 samples by enriched culture method in a medium containing L-sorbose as sole source of carbon. Bacteria N1197A is a strain capable of producing vitamin C precursor——2-keto-L-gulonic acid from L-sorbose. It is a mixed culture of two different species of bacteria. The bacteria which produces larger colonies on cultural plate does not produce any 2-keto-L-gulonic acid. The other bacteria which produces

minute pin-point colonies on cultural plate can produce 2-keto-L-gulonic acid, but in little amount. The former one is *Pseudomonas striata* and the latter one is *Gluconobacter oxydans*.

The fermentation product isolated and purified from culture broth is a white crystal. It has been identified as 2-keto-L-gulonic acid by paper chromatography, elementary analysis and infra-red absorption spectrum etc.