

L-山梨糖发酵产生维生素 C 前体——2-酮基-L-古龙酸的研究

II. 发酵条件的研究

严自正 陶增鑫 于龙华 尹光琳

(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

余菊芬 王明寿 于秀菊

(北京制药厂)

对产生维生素 C 前体 2-酮基-L-古龙酸的优良菌株 N 1197 A, 进行了一系列摇瓶条件试验。添加玉米浆及尿素是提高产酸的有效手段, 尿素浓度以 0.5—0.8% 为好, 确定了培养基组成(%)为: K_2HPO_4 0.07, KH_2PO_4 0.03, 甘油 0.2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01, 轻体 $CaCO_3$ 0.5, 玉米浆 0.5, 尿素 0.5, 自来水配制, 自然 pH。在碳酸钙添加试验中, 当培养基中有尿素时, 不加碳酸钙与加碳酸钙产酸量相同。分批补加尿素或 $(NH_4)_2HPO_4$ 使发酵液 pH 保持在 6—6.5, 产酸量随着补加次数加多而增加。在发酵过程中, 补加尿素调节发酵液 pH 是本发酵的特点。

培养基中山梨糖浓度为 7%, 产酸稳定在 30 毫克/毫升, 转化率 39.7%。增加山梨糖浓度至 10%, 并增加尿素用量, 产酸可达 37 毫克/毫升, 转化率 34.3%。

本文中提到了 N1197A 是含有菌落大小不同的两种菌的混合菌株, 只有当两者同时存在时, 才能顺利进行由 L-山梨糖转化成 2-酮基-L-古龙酸这一生物氧化过程。

前文已报道了产生维生素 C 前体 2-酮基-L-古龙酸 (简称 2-KGA) 的优良菌株 N 1197 A 的筛选^[1], 在此基础上, 我们进行了一系列摇瓶发酵条件试验, 使 2-KGA 的产量大幅度提高, 为扩大试验提供了依据, 本文报道这方面的试验结果。

材料与 方法

(一) 菌种: N1197A

(二) 培养基

1. 普通牛肉汁琼脂斜面。

2. 种子培养基组成(%) : 山梨糖 0.5, 酵母膏 0.3, 牛肉膏 0.3, 蛋白胨 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2,

自来水配制, pH7.0。

3. 发酵培养基组成(%) :

A. 山梨糖 7. 酵母膏 0.1, K_2HPO_4 0.07, KH_2PO_4 0.03, 甘油 0.2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01, 轻体 $CaCO_3$ 0.5, 自来水配制, 自然 pH。

B. 除了用玉米浆 0.5 和尿素 0.5 代替酵母膏外, 其余均同 A。

(三) 摇瓶发酵

将在牛肉汁琼脂斜面上培养 24 小时的菌体接入种子培养基 (3 毫升, 116℃ 灭菌 20—30 分

本文于 1980 年 1 月 24 日收到。

本工作在北京制药厂进行, 于 1971 年 12 月完成。

钟), 28—30℃ 摇床培养 16—18 小时, 接入发酵培养基(200 毫升三角瓶装 15—20 毫升为宜, 116℃ 灭菌 20—30 分钟), 接种量约 10%, 28—30℃ 摇床培养 6 天, 往复式摇床振速 110 次/分, 振幅 7 厘米。

(四) 分析方法

发酵終了, 用精密 pH 试纸测发酵液 pH, 用纸层析法^[1]测定 2-KGA 含量, 将发酵液适当稀释后与标准的 2-KGA (1 毫克/毫升) 同时分别点样于一张滤纸上, 展开和显色后与标准色斑进行比较, 并根据稀释倍数算出 2-KGA 的产量。菌体生长情况经革兰氏染色后, 用显微镜油镜观察。用 72 型分光光度计测发酵液混浊度, 波长为 620 毫微米, 光程 0.5 厘米。

实验结果与讨论

(一) 附加碳源对产 2-KGA 的影响:

发酵培养基中 L-山梨糖既作为菌的生长碳源又作为底物被转化为 2-KGA。为使菌体长得更好以提高酸的产量, 我们进行了添加其他碳源的试验, 结果见表 1。结果表明培养基中添加葡萄糖和麦芽糖均能在一定程度上提高酸的产量, 尤其是 0.3%。葡萄糖和 0.2% 果糖效果更好, 而 0.1% 石蜡油和 0.1% 醋酸对产 2-KGA 没有影响。

表 1 不同附加碳源对产 2-KGA 的影响

附加碳源	用量(%)	发酵終了 pH	2-KGA (毫克/毫升)
麦芽糖	0.5	5.3	10.5
果 糖	0.2	5.3	12.5
葡萄糖	0.05	5.4	10.5
葡萄糖	0.1	5.2	11.0
葡萄糖	0.3	5.1	13.0
醋 酸	0.1	5.2	9.0
石蜡油	0.1	5.4	9.0
对 照		5.4	9.0

(二) 不同天然有机物对产 2-KGA

的影响: 在发酵培养基 A 中添加不同天然有机物, 结果见表 2。由表 2 可见玉米浆

对产 2-KGA 有促进作用, 而西红柿汁, 豆芽汁和土豆汁对 2-KGA 的生成还不如酵母膏好。

表 2 不同天然有机物对产 2-KGA 的影响

天然有机物	用量(%)	发酵終了 pH	2-KGA (毫克/毫升)
玉米浆	0.2	5.2	12
豆 饼 粉	0.2	5.3	11
麦 芽 汁	0.2	5.3	10
土 豆 汁	0.2	5.3	8
豆 芽 汁	0.2	5.2	8
西红柿汁	0.5	5.2	8
对 照 (酵母膏)	0.1	5.1	11

(三) 不同氮源对产生 2-KGA 的影

响: 在发酵培养基中添加不同氮源用量均为 0.2%, 结果表明, 尿素、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 及 NH_4AC 均能促进 2-KGA 的产生, 尤其是尿素效果更为明显, 而 NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 NH_4NO_3 都能在一定程度上抑制 2-KGA 的产生, 结果见表 3。

(四) 尿素浓度与 2-KGA 产量的关

系: 试验分两组进行, 第一组用培养基 A, 第二组将培养基 A 中的酵母膏换成玉米浆。结果均以 0.5—0.8 尿素为好(见图 1)。

表 3 不同氮源对 2-KGA 产量的影响

氮 源	发酵終了 pH	2-KGA (毫克/毫升)
NH_4Cl	5.1	5
NH_4NO_3	5.1	7
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5.0	9
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	4.8	12
NH_4AC	4.9	12.5
尿素	3.8	15
对 照	5.3	10

从图 1 可以看到增加尿素, 发酵終了 pH 也相应高, 当尿素超过 1% 时, 发酵終了 pH 上升至 7.0 以上, 产酸反而下降, 为了搞清是过量的尿素还是 pH 偏碱抑制了酸的产

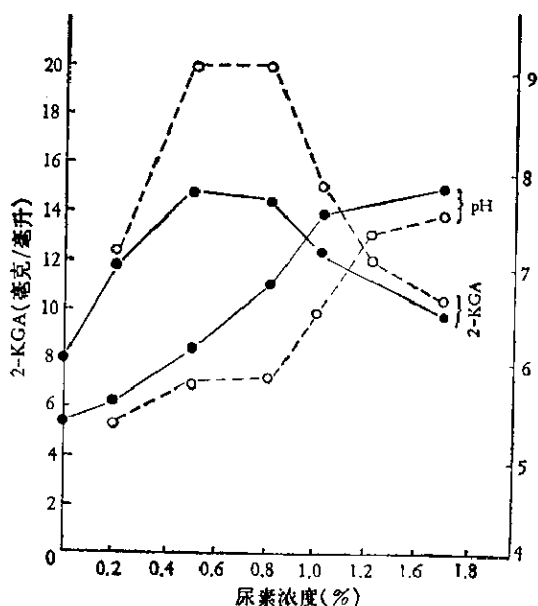


图1 尿素浓度对2-KGA产量的影响

○——○ 培养基 A + 玉米浆
●——● 培养基 A

生, 我们进行分批补加尿素试验。从生产考虑, 还试验了用工业用尿素进行补加, 结果与试剂尿素效果相同。

(五) 发酵期间分批补加尿素和 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 对产 2-KGA 的影响: 发酵培养基 A 分别预先加尿素 0.2% 或 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.5%, 然后分别补加尿素 0.2% 或 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.5%, 每隔 24 小时补加一次。发酵终了测 pH。结果两者效果一致, 随着补加次数的增加, 酸的产量亦随之增

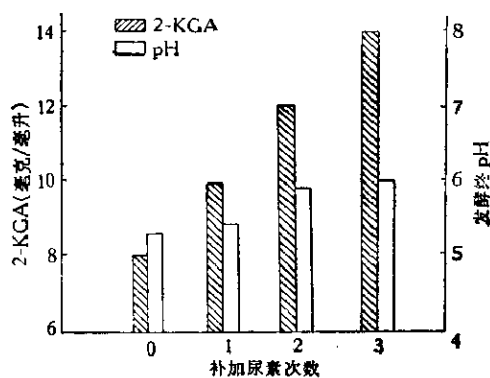
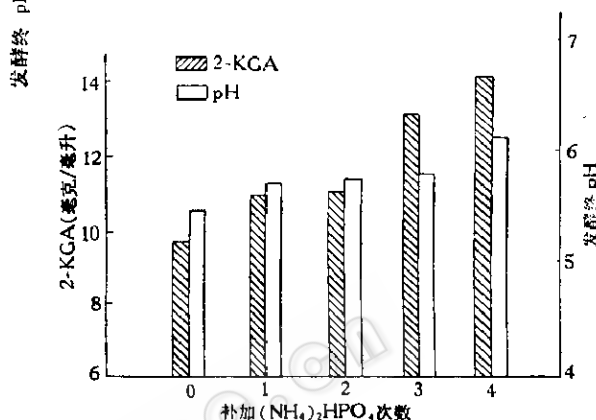


图2 发酵期间补加尿素对产 2-KGA 的影响

加, 而 pH 值上升缓慢, 均在 pH6 上下, (见图 2, 3)。从几组试验的结果看来, 发酵期间发酵液 pH 和产酸似有密切联系, 显然尿素与 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 不仅提供了氮源, 而且还起着调节 pH 的作用。

图3 发酵期间补加 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 对产 2-KGA 的影响

(六) 发酵培养基初始 pH 与产 2-KGA 的关系: 用灭过菌的 1% NaOH 将培养基的 pH 分别调至 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0。接种, 发酵终了发酵液 pH 均下降到 5.0—5.6, 2-KGA 的产量调与不调均较接近, 其中以 pH 7.0 为较好。初步认为发酵培养基初始 pH 从 6.0—8.0 对产酸没有什么影响, 因此, 当培养基在灭菌后 pH 在 6.0 以上即不再调节 pH。

(七) 碳酸钙对产 2-KGA 的影响: 以上试验表明培养基中添加尿素是很重要的, 因此将培养基 A 中的酵母膏去掉, 代以玉米浆 0.5% 和尿素 0.5% 组成培养基 B, (见方法) 将此培养基及培养基 A 中的碳酸钙用量改变来观察对产酸的影响。试验分三组: 第一组: 培养基 A, 第二组: 培养基 A + 尿素 0.2%, 第三组: 培养基 B, (结果见表 4)。看来培养基 pH 过低能抑制酸的产生, 这可由碳酸钙添加与否的试验结果来说明。当培养基中不加尿素时, 培养基中

表 4 碳酸钙用量对产 2-KGA 的影响

碳酸钙用量 (%)	发酵终了 pH			2-KGA (毫克/毫升)		
	第一组	第二组	第三组	第一组	第二组	第三组
0	4.9	5.1	5.4	0	9	30
0.25			5.4			30
0.5	5.3	5.8	5.4	6	10.5	30
0.8	5.4	5.8		7	11	
1.0	5.3	5.8	5.4	9	9.5	31
1.5	5.5	5.9		8	10	

唯一能中和酸的就是碳酸钙,因此其对产酸的有利作用就明显地显示出来。如果培养基中不加碳酸钙,则发酵液的 pH 下降至 5.0 以下,严重抑制了产酸。当培养基中有尿素时,则碳酸钙的添加与否对产酸没有显著影响。由此也能说明加尿素可以中和酸,起着调节 pH 的作用,使发酵液 pH 不致降得太低而抑制酸的产生。分批补加尿素或 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 均能使发酵液 pH 回升,使 2-KGA 继续产生。这里提出一个问题:尿素和 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 在发酵过程中的作用主要是补充氮源,还是使发酵液 pH 保持在适宜范围,从而使山梨糖得以顺利转化为 2-KGA,如果仅仅是后者,看来除碳酸钙之外,还可用其他方法控制 pH,以达到同样的目的。

(八) 山梨糖浓度对产 2-KGA 的影响: 根据以上试验 N1197A 在培养基 B 中产酸可达 30 毫克/毫升,因此以下试验均用培养基 B 为基础,在山梨糖浓度的试验中,当山梨糖浓度增加至 8 或 10%,单位体积产酸量下降幅度不大,而达 15—20%,则产酸受到严重抑制。从转化率来看,糖浓度达 8% 即下降,其原因是否是氮源不够?因此又用山梨糖浓度为 10% 的培养基 B 作基础,进行了增加尿素用量的试验,结果,当尿素为 1.0% 时,单位体积产酸可提高到 37 毫克/毫升,转化率相应地增至 34.3%,相当于原来 8% 的糖时的转化率,这说

明当糖浓度增加时,其他条件也要相应改变,这样才能提高单位体积产酸量和转化率,结果见表 5、6。

表 5 提高山梨糖浓度对 2-KGA 形成的影响

山梨糖浓度 (%)	发酵终了 pH	2-KGA (毫克/毫升)	转化率* (%)
7	5.4	30.0	39.7
8	5.8	30.0	34.8
10	5.8	27.5	25.5
12	5.8	25	19.3
15	5.8	微	0
20	5.8	0	0

$$\begin{aligned} \text{* 转化率}(\%) &= \frac{\text{2-KGA 生成量 (毫克/毫升)}}{\text{L-山梨糖添加量 (毫克/毫升)}} \\ &\times 0.928 \times 100 \\ &(\text{0.928 系 2-KGA 与 L-山梨糖分子量之比}). \end{aligned}$$

表 6 提高山梨糖浓度及相应增加尿素用量对产酸影响

山梨糖 用量 (%)	尿素用量 (%)	发酵终了 pH	2-KGA (毫克/毫升)	转化率* (%)
10	0.2	5.4	31	28.7
10	0.5	5.5	35	32.5
10	0.8	5.8	35	32.5
10	1.0	6.4	37	34.3
10	1.2	7.4	34	31.5

* 同表 5

望月一男^[2]利用一株经紫外线诱变的假单孢菌以 L-山梨糖为原料发酵生产 2-KGA,发酵液含 2-KGA 仅达 2.65 毫克/毫升。我们利用 N1197A 这一混合菌株,在摇瓶发酵时,当山梨糖为 7% 时,2-KGA

产量即能达 30 毫克/毫升。可以预料,在生产中如采用补加尿素和山梨糖等措施,会使 2-KGA 的产量大大提高,从而逐步代替几十年来国内外一直沿用的莱氏化学合成法^[1]生产维生素 C。

(九) 消泡剂对产 2-KGA 的影响:
在培养基 B 中加两种消泡剂,并试验了不同用量,结果表明,液体石蜡即使增加到 0.39%,对产 2-KGA 也没有影响,而玉米油增加到 0.39% 即能抑制 2-KGA 的产生,结果见表 7。

表 7 消泡剂对产 2-KGA 的影响

消泡剂	消泡剂用量 (%)	发酵終了 pH	2-KGA (毫克/毫升)
液体石蜡	0.13	5.6	28
	0.26	5.9	30
	0.39	5.8	28
玉米油	0.13	5.5	28
	0.26	5.4	26
	0.39	5.4	7
对 照	0	5.4	28

表 8 金属对产 2-KGA 的影响

不同金属	发酵終了 pH	2-KGA (毫克/毫升)
锈铁片	5.6	30
铝 片	5.6	30
铁 片	5.4	30
红铜片	6.0	微
黄铜片	6.4	0
对 照	5.6	30

(十) 金属及金属盐类对产 2-KGA 的影响: 在培养基 B 中加入不同种类的金属片,结果表明,铁和铝对产酸没有影响,而铜则会抑制酸的形成,见表 8,因此,今后在生产中可以考虑采用铁缶。各种金属盐类如 FeCl_3 (浓度 0.5—500 ppm), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (浓度 0.5—500 ppm), AlCl_3 (浓度 0.5—500 ppm) 对产酸没有影响。

(十一) 种龄与 2-KGA 产量的关系:
用斜面菌种接入种子培养基,摇床培养,每 2 小时无菌取样接入发酵培养基 B。同时测定种液混浊度以了解种子生长情况,试验表明在所试验的条件下种龄对发酵最终产酸并没有影响,均稳定在 30 毫克/毫升,从菌的生长情况来看,在 6 小时以前直线上升 6 小时以后则生长缓慢,见图 4。

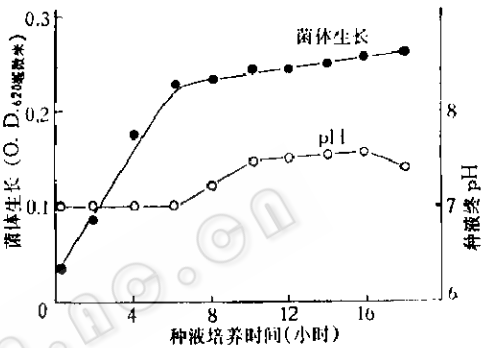


图 4 种液培养时菌体生长情况

(十二) 接种量对 2-KGA 产量的影响: 种子培养 18.5 小时,按不同比例接入发酵培养基,结果见表 9,接种量即使低到 1:30,对最终酸产量也没有显著影响,这可能由于摇瓶试验发酵时间较长因而无法观察到种龄与接种量对产酸的影响。

表 9 接种量对产 2-KGA 的影响

接种量比 (V/V)	发酵終了 pH	2-KGA (毫克/毫升)
1:30*	5.4	27
1:15	5.4	29
1:10	5.4	30
1:7.5	5.4	29
1:6	5.4	30
1:5	5.4	30

* “1”培养好的种液,“30”发酵培养基,其它类推。

(十三) 种子培养基初始 pH 及组成:
试验表明种子培养基初始 pH 6—8,山梨糖 0.5—4% 以及去掉牛肉膏及蛋白胨均不影响产酸。

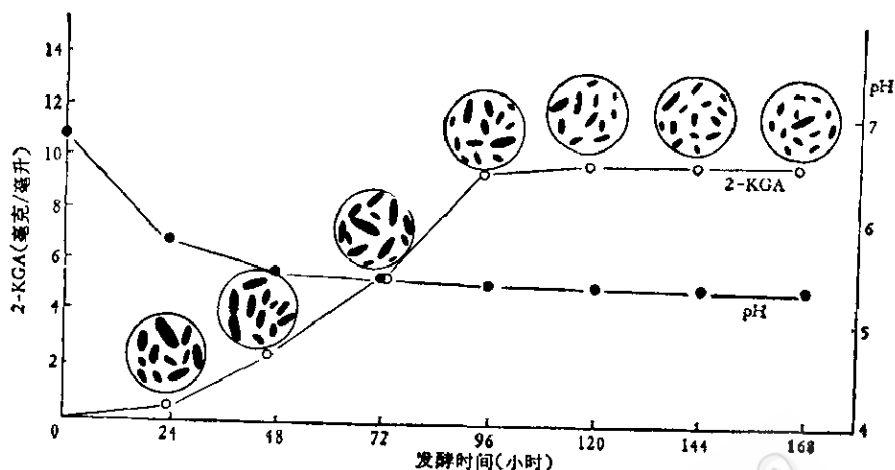


图5 发酵过程中菌形变化与产2-KGA关系

(十四) 发酵期间产酸与菌群形态变化的关系: 在摇瓶发酵期间曾观察了菌体变化和产2-KGA的关系,结果见图5(示意图)。由图中可以看出发酵过程中明显存在着大菌和小菌,在发酵前期,大菌数量较多,到后期则较少,在产2-KGA的旺盛期,也正是大菌和小菌的数量处于急剧变化的阶段。这种现象早在摇瓶发酵试验的初期即观察到,而且在另一株产2-KGA较好的菌株——N1183 C^[1]也观察到同样的现象。在发酵过程中,也发现有时染菌后不产酸或产酸较少,但有时,虽染菌却也能正常产酸,这可能所染的菌并不妨碍N1197A菌株的正常发酵。因此我们曾将某一次放大试验的发酵液和液体石蜡保藏的菌株进行了平板划线分离,出现了大小较为悬殊的两种菌落,将这些菌落分别挑出并进行产2-KGA的比较。经过反复试

验,证实N1197A菌株是由菌落大小不同的两种菌组成的混合培养物,呈大菌落的大菌不产2-KGA,呈小菌落的小菌微产2-KGA,只有当两者同时存在时,才能正常地完成由山梨糖转化成2-KGA这一过程¹⁾。以上这些现象都有待进一步探讨,这不仅为了在生产实践中更好地控制2-KGA的生产,而且也是为了从理论上进一步阐明这一代谢过程的机制。

参 考 资 料

- [1] 尹光琳等:微生物学报,20(3):246—251,1980年。
- [2] 望月一男:特许公报,昭41-16,19B67(36F0),1967。
- [3] U. S. Patent: 2421611, 1947。

1) 关于证实N1197A系一混合菌株,以及两种菌之间的相互关系,已超出本文范围,故不拟详述。

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

II. CONDITIONS FOR SUBMERGED FERMENTATION OF 2-KETO-L-GULONIC ACID

Yan Zizheng Tao Zengxin Yu Longhua Yin Guanglin

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

Ning Wenzhu Wang Changhui Wang Shuding Jiang Huifeng

Yu Jufen Wang Mingshou Yu Xiuju

(*Beijing Pharmaceutical Factory*)

The fermentation of vitamin C precursor 2-keto-L-gulonic acid (2-KGA) with strain N1197A was studied extensively. The data obtained showed that the addition of corn steep liquor and urea increased the 2-KGA yield significantly. The concentration of urea ranging from 0.5—0.8% was optimal. The constituents of the medium in percentage were as follows: L-sorbose 7, K_2HPO_4 0.07, KH_2PO_4 0.03, glycerin 0.2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01, $CaCO_3$ 0.5, corn steep liquor 0.5, urea 0.5, tap water, natural pH. When the medium contained urea, $CaCO_3$ was not necessary as a pH regulator. Periodical feeding of urea or $(NH_4)_2HPO_4$ during fermentation resulted in maintenance of pH in the range of 6—6.5, and an increase of 2-KGA.

When the medium contained 7% L-

sorbose, the yield of 2-KGA was kept at 30 mg/ml and the rate of conversion was 39.7%. The requirement of urea was in parallel with concentration of L-sorbose. In a 10% L-sorbose medium with adequate concentration of urea, the rate of conversion reached 34.3% and the 2-KGA yield was 37 mg/ml.

The present paper showed that strain N1197A actually is a mixed population consisting of small and big colony formers. The small one produces trace amount of 2-KGA when growing alone and the bigger one produces nothing at all. Only when both kinds co-existed the process of converting L-sorbose into 2-KGA can be carried out in large quantities successfully.