

从 D-葡萄糖直接发酵产生维生素 C 前体—— 2-酮基-L-古龙酸*

I. 菌株的诱变选育和代谢产物的鉴定

尹光琳 马志方 董文玲 林海叶 晴

(中国科学院上海生物工程研究中心,上海)

2-酮基-L-古龙酸是合成维生素C的前体,以D-葡萄糖为原料经两种微生物串联发酵直接制备。本文报道了用紫外线照射和硝基胍处理等方法对2-酮基-L-古龙酸及其中间体2,5-二酮基-D-葡萄糖酸(盐)产生菌的诱变选育。葡萄糖酸杆菌(*Gluconobacter* sp.) SCB 611在含D-葡萄糖、玉米浆和碳酸钙的培养基中,经48小时培养后,可生成2,5-二酮基-D-葡萄糖酸(盐)。同时也选出了一株欧文氏菌(*Erwinia* sp.) SCB 247,它的产酸能力比前者明显要高。棒状杆菌(*Corynebacterium* sp.) SCB 3058在以D-葡萄糖作为氢载体的情况下,经过三天摇瓶发酵,能将经SDS处理的2,5-二酮基-D-葡萄糖酸(盐)有效地转化为2-酮基-L-古龙酸。

上述菌株的代谢产物经分离提取后用熔点测定、元素分析、红外和紫外吸收光谱测定等鉴定,可以确证菌株SCB 611或(SCB 247)及菌株SCB 3058的代谢产物分别是2,5-二酮基-D-葡萄糖酸(盐)和2-酮基-L-古龙酸。

关键词 2-酮基-L-古龙酸(2-KLG); 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸(盐)(2,5-DKG); L-抗坏血酸(维生素C); 葡萄糖酸杆菌; 欧文氏菌; 棒状杆菌

维生素C是人体必需的维生素,其生理作用广泛,在医药和食品工业上均有重要地位^[1]。1989年全世界维生素C总产量近70000吨。

1933年德国Reichstein等人首先用化学合成法制取维生素C获得成功,至今大多数国家仍采用此法进行生产^[2]。该方法需经五步反应过程,并消耗大量有毒和易燃、易爆的化学物质。因此,近五十年来,许多国家相继开展了简化Reichstein法(即“莱氏法”)的研究^[3-6]。我国发明的经L-山梨糖发酵产生2-酮基-L-古龙酸的新工艺(即“二步发酵法”)^[7]已在七十年代末期用于工业化生产。然而,无论“莱氏法”或“二步发酵法”,都需要D-葡萄糖加

氢(用镍催化)还原所生成的D-山梨醇作原料,给扩大生产带来了诸多不便。从维生素工业化生产的发展前景来看,用D-葡

本文于1990年8月15日收到。

* 本工作承焦瑞身教授的关心支持及提出宝贵意见,深表谢忱。

上海交通大学周建龙、方榕同志曾参加前期部分工作;微生物研究所蔡妙英教授对菌种鉴定提出宝贵意见,一并致谢。

承瑞士Hoffmann La-Roche Co. 制药公司、日本Shionogi Co. 制药株式会社惠赠部分标准样品及试验菌株;承南京农业大学赠送部分试验菌株和中国科学院生物化学研究所提供葡萄糖试测试仪并予以帮助;承上海交通大学理化中心代测红外吸收光谱;中国科学院有机化学研究所分析室代测元素分析,中国科学院植物生理研究所照相室和电镜室代摄照片;特此一并致谢。

本工作系中国科学院生物科学与技术局1990年度预研资助项目和上海市1989—1990年自然科学基金项目。

葡萄糖直接发酵生成 2-酮基-L-古龙酸 (2-KLG) 作为制备维生素 C 的前体是很有经济价值的^[2]。

近年来,美国 Anderson 等人^[3]和瑞士 Hardy 等人^[4]成功地应用重组 DNA 技术构建成一株基因工程菌,可将 D-葡萄糖直接转化产生 2-酮基-L-古龙酸^[5]。在这之前,日本园山高康等人对用两株细菌进行从 D-葡萄糖经两步发酵生产 2-KLG 已有过许多报道^[6,11-14]。第一步发酵用 A 组菌株,计有: 醋酸单胞菌 (*Acetomonas* sp.)、葡萄糖酸杆菌 (*Gluconobacter* sp.)、醋酸杆菌 (*Acetobacter* sp.) 或欧文氏菌 (*Erwinia* sp.); 第二步发酵用 B 组菌株为: 棒状杆菌 (*Corynebacterium* sp.) 或短杆菌 (*Brevibacterium* sp.)。A 组菌株可将 D-葡萄糖转化生成 2, 5-二酮基-D-葡萄糖酸(盐) (2, 5-DKG); 而 B 组菌株则可将 2, 5-DKG 转化成 2-酮基-L-古龙酸 (2-KLG)。

关于从 D-葡萄糖发酵转化产生 2-酮基-L-古龙酸的研究,国内至今尚未见诸报道。近两年来,我们在菌株诱变选育、代谢产物鉴定、发酵条件和发酵工艺研究等方面进行了研究,本文先报道菌种的诱变选育和代谢产物鉴定的结果。

材料和方法

(一) 化学试剂

2-酮基-D-葡萄糖酸(钙盐)(2-KDG)和 5-酮基-D-葡萄糖酸(钙盐)(5-KDG)系美国 Sigma 公司产品; D-葡萄糖酸(D-Gluconic acid)系上海试剂二厂产品; 2, 5-二酮基-D-葡萄糖酸(钙盐)(2, 5-DKG)和 2-酮基-L-古龙酸(2-KLG)系瑞士 Hoffmann La-Roche Co. 公司和日本 Shionogi 公司惠赠。

(二) 菌株

1. A 组菌株: 葡萄糖酸杆菌 (*Gluconobacter* sp.) SCB 611, 欧文氏菌 (*Erwinia* sp.) SCB 247 系从土样中分离的菌株及收集的各种来源菌株筛选获得亲本株诱变选育得来。

2. B 组菌株: 棒状杆菌 (*Corynebacterium* sp.) SCB 3058。系将原有产酸量偏低且产物不稳定的出发菌株作为亲本株再进行诱变选育而得到。

(三) 培养基组分

1. A 菌株用培养基:

(1) 斜面培养基[完全培养基(OM)]组分(%): D-葡萄糖 2, 甘油 0.5, 酵母粉 0.5, 多聚蛋白胨 0.3, CaCO₃ 0.5 和琼脂 2。pH 6.5—6.7。

(2) 选择培养基(MM)组分(%): D-葡萄糖 10, 酵母粉 0.5, 玉米浆 1, KH₂PO₄ 0.1, CaCO₃ 3, MgSO₄ · 7H₂O 0.02, 琼脂 2。pH 6.7—7.0。

(3) 种子培养基组分(%): D-葡萄糖 1, 玉米浆 5, CaCO₃ 0.5, KH₂PO₄ 0.1 和 MgSO₄ · 7H₂O 0.02, 用自来水配制。pH 6.8—7.0。121℃ 灭菌 30 分钟。

(4) 发酵培养基组分(%): D-葡萄糖 5—10(单独灭菌), 玉米浆 3, NH₄H₂PO₄ 0.1, CaCO₃ 3.2 和 K₂HPO₄ 0.05, 自来水配制。pH 7.0。121℃ 灭菌 30 分钟。

欧文氏菌 SCB 247 的斜面培养基组分(%): D-葡萄糖 0.3, CaCO₃ 0.75, 酵母粉 0.5, NZ-amine 0.2, 琼脂 2%。pH 6.7—7.0。其余均同上述培养基组分。

2. B 菌株用培养基:

(1) 斜面培养基[完全培养基(CM')]组分: 同常规牛肉汁固体培养基。pH 7.0—7.2。

(2) 选择培养基(MM')组分(%): 5-酮基-D-葡萄糖酸(钙盐)或 D-葡萄糖酸(盐) 1, NH₄Cl 0.5, NH₄NO₃ 0.1,

KH_2PO_4 0.3, K_2HPO_4 0.1, 维生素混合液 0.1, 微量元素混合液 0.1。pH 7.0。

(3) 种子培养基组分(%)：D-葡萄糖 1, 酵母粉 0.5, 蛋白胨 0.5, KH_2PO_4 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, 自来水配制。pH 7.0。121℃ 灭菌 30 分钟。

(4) 发酵培养基组分(%)：D-葡萄糖 1, 玉米浆 3, KH_2PO_4 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, 自来水配制。pH 7.0。121℃ 灭菌 30 分钟。

(四) A 菌株产生 2, 5-DKG 的培养条件

将葡萄糖酸杆菌 SCB 611 接种到斜面培养基上, 于 28℃ 培养 48 小时后, 取新鲜菌苔一满环接种至装量 25 ml 种子培养基的 250 ml 三角瓶内, 在 28—30℃ 旋转摇床 (NBS) 上培养 18—20 小时, 转速 250 r/min。将种子液接种到发酵培养基内, 接种量 10%, 28—30℃ 摇瓶发酵 2 天。

2, 5-DKG 发酵结束后, 用十二烷基磺酸钠 (SDS) 处理发酵液, 随即接种棒状杆菌 SCB 3058 进行 2-酮基-L-古龙酸 (2-KLG) 发酵。

欧文氏菌 SCB 247 的培养, 除斜面培养基组分不同外 (见“材料与方法”), 其他均与葡萄糖酸杆菌 SCB 611 相同。

(五) B 菌株产生 2-KLG 的条件

将棒状杆菌 SCB 3058 接种到常规牛肉汁斜面, 于 28℃ 培养 40 小时, 取新鲜菌苔一满环接种至种子培养基内, 在 28—30℃ 旋转摇床 (NBS) 上培养 20 小时, 转速 250 r/min。将种子液接种到发酵培养基内, 接种量 10%, 28—30℃ 摇床发酵 3 天, 即可将经 SDS 处理过的 2, 5-二酮基-D-葡萄糖酸 (钙盐) (2, 5-DKG) 发酵液转化生成 2-酮基-L-古龙酸 (2-KLG)。

(六) 菌株的诱变选育

从土样中分离的菌株及收集的各种来

源菌株经初筛后确定产 2, 5-DKG (或 2-KLG) 亲本株。经完全培养基 (CM 或 CM') 振荡培养获得细胞浓度为 $10^8/\text{ml}$ 的新鲜菌悬液用紫外线处理 5 分钟, 测定存活菌数 (致死率), 离心洗涤菌体后再重新悬浮在完全培养基中。28℃ 避光增殖过夜, 测定活菌数后用 0.1 mol/L Tris-马来酸 (Maleic acid) 缓冲液 (pH 6.0) 洗菌体并配成细胞浓度为 $10^8/\text{ml}$ 的菌悬液, 用浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 硝基胍 (NTG) 在 28℃ 处理 30 分钟。离心洗涤菌体后, 涂 CM 平皿测致死率, 涂选择用培养基 (MM) 挑选突变株。再用种子培养基进一步筛选。UV 处理后致死率 95—99%, NTG 处理后致死率 45%。

(七) 分析测定方法

1. pH 值用哈尼 (HONY) 101 型或美国 COLE PAMER 型酸度/温度计测定。

2. 菌体生长测定: 取菌悬液 0.5 ml, 用 0.1 mol/L HCl 稀释 10 倍, 于 721 型或 752 型分光光度计上 (光程 1 cm) 测定吸光度 A_{660} 。

3. 2, 5-二酮基-D-葡萄糖酸 (钙盐) (2, 5-DKG) 含量测定: 用修改后的园山高康等人的方法^[4] (即 $\text{NH}_4\text{OH-HCl}$ 法) 进行测定。

4. 2-酮基-L-古龙酸 (2-KLG) 含量测定: 采用转化碘量法和修改的 18-磷钨酸法^[6,7,14], 将含有 2-KLG 的发酵液加酸反应转化成维生素 C 后再进行测定。

5. 产物的定性鉴定: 按 *Wakisaka* 所描述的纸层析方法修改后进行^[15]。采用苯酚-甲酸-水 (75:4:25, V/V) 展开剂和邻苯二甲酸-苯胺显色剂 (AHF), 可根据斑点颜色及 R_f 值鉴别 2-KLG、2, 5-DKG、2-KDG、5-KDG、D-葡萄糖酸 (D-GA) 和 D-葡萄糖等。

6. D-葡萄糖含量测定: 根据葡萄糖传感器的反应原理, 当含 D-葡萄糖的样品

注入反应池中后,使其扩散到葡萄糖氧化酶电极的酶膜上,即发生氧化反应。当消耗溶液中的 O_2 后,在一定时间内电位值显示会有所减少,可从标准曲线上计算出 D-葡萄糖的含量。

结果和讨论

(一) 产生 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸(盐)(2,5-DKG) 优良菌株的选育

将从土样中分离的菌株及由各种来源的菌株共数百株经反复筛选后获得产 2,5-DKG 的葡萄糖酸杆菌及欧文氏菌各数株,挑选其中两株菌作为亲本株进行诱变,再经复筛后从近百株突变株中获得产酸量较为稳定的葡萄糖酸杆菌 SCB 611 和欧文氏菌 SCB 247。其中,葡萄糖酸杆菌 (*Gluconobacter* sp.) SCB 611 比原出发菌株产 2,5-DKG 量提高了 21.69%; 欧文氏菌 (*Erwinia* sp.) SCB 247 产 2,5 DKG 量为 44.21 mg/ml, 而原出发菌株产 2,5-DKG 量为 36.0 mg/ml, 提高了 22.80% (D-葡萄糖底物浓度 100 mg/ml, 28℃ 摇

床发酵 48 小时后测定结果)。在经发酵条件研究后,诱变株的产酸保持稳定并有一定的提高。

SCB 611 系葡萄糖酸杆菌属 (*Gluconobacter*) 菌株,细胞短杆状,革兰氏染色阴性,无芽孢,28—30℃ 培养 2 天后细胞大小为 $0.6-0.9 \times 1.5-1.9 \mu\text{m}$, 单个或成对排列。在葡萄糖-碳酸钙的平板培养基上可观察到明显的溶钙圈,培养 7—10 天后浅灰色的圆形菌落呈浅褐色,并随时间增加而颜色加深。pH 4.5 时生长并能氧化葡萄糖产酸。最适 pH 6.5—6.7。生理生化特征从略。

SCB 247 系欧文氏菌属 (*Erwinia*) 菌株,细胞短杆状,革兰氏染色阴性,无芽孢。28—30℃ 培养三天后,细胞大小为 $0.6-0.8 \times 1.2-3.5 \mu\text{m}$, 单个排列,次端生鞭毛,有粘液物质形成。未见到多形态细胞,但可观察到有丝状结构物形成(图 1)。菌落圆形、平滑,培养三天以上灰白色菌落表面出现皱褶。可在 pH 4.5 微弱生长,最适 pH 6.5—8.0, 生长温度 10—45℃, 最适生

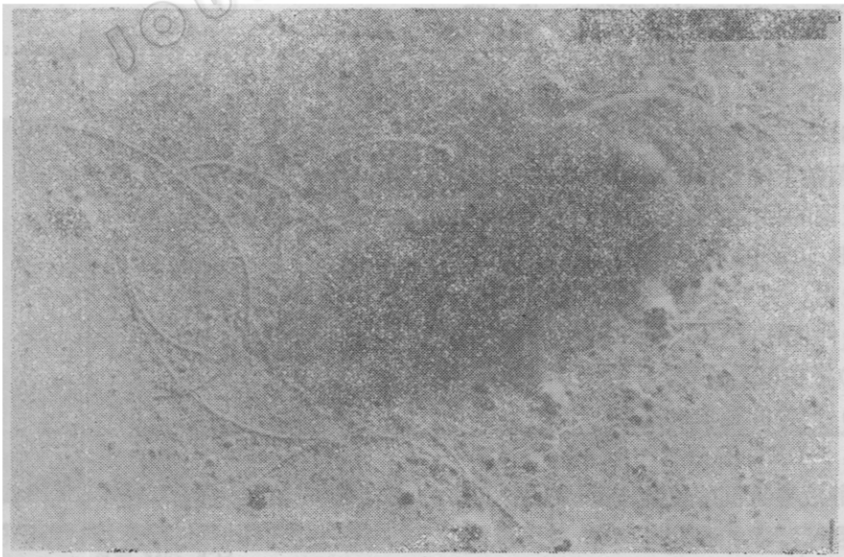


图 1 欧文氏菌 SCB 247 的细胞形态 ($\times 20000$ 倍)

Fig. 1 Electromicroscopic picture of *Erwinia* sp. SCB 247 ($\times 20000$)

长温度 25—35℃, 利用葡萄糖产酸。其余生理生化特征从略。

(二) 产生 2-酮基-L-古龙酸(2-KLG)

优良菌株的选育

所用亲本株系棒状杆菌属菌株, 经采用与 A 菌株相类似的诱变处理方法(两者培养基不同)进行选育和复筛后, 从中选出 12 株产量较高又产酸稳定的菌株, 既不产生 2-酮基-D-葡萄糖酸(钙盐)(2-KDG), 又不利用 5-酮基-D-葡萄糖酸(盐)(5-KDG), 以菌株 SCB 3058 更为稳定, 产酸量如表 1 所示。

菌株 SCB 3058 细胞呈短杆状, 革兰氏染色阳性至可变, 无芽孢。在普通牛肉汁斜面培养基上 30℃ 培养二天后, 细胞大小为 0.6—0.8 × 0.9—2.1 μm, 单个或成对排列, 可观察到明显的栅状交叉排列。菌落圆形, 表面光滑微有突起, 边缘整齐, 菌落呈闪光的黄色(图 2)。在含硝酸盐及铵盐的培养基上生长良好。最适生长温度 23—28℃, 最适 pH7.0—8.0。可利用 D-GA 及微弱利用 2-KDG。

由于 2, 5-DKG 对热不稳定, 将 A 菌株生成的 2, 5-DKG 发酵液(活菌数为 10⁸—10⁹/ml) 加入 250 μg/ml 左右的表面活性剂 SDS, 可降低发酵液中存活细胞数, 当活菌数下降至 1.4 × 10³/ml 左右, 已达到灭菌的目的。此后即可加入到棒状杆菌 SCB 3058 的培养基中, 直接用于下一步的转化。关于 SDS 对发酵的影响以及发酵条件优化(产生 2-KLG 达 4.50mg/ml 以上)将在以后讨论。

(三) 产物的提取和鉴定

1. 2, 5-DKG 的分离和提取: 将 2, 5-DKG 发酵液静置沉降或离心除去细胞, 用 HCl 调至 pH 2.5, 于 35—37℃ 减压浓缩滤液至 1/4 体积左右, 滴加冷乙醇使其含量为 90%, 置冷处数小时后抽滤, 将沉淀

表 1 某些棒状杆菌突变株产生 2-KLG 的能力^{a, b}
Table 1 Production of 2-KLG from 2,5-DKG by^{a, b} Some Mutants of *Corynebacterium* sp.

菌 株 Strains	产生的 2-KLG Accumulated 2-KLG ^c (mg/ml)
<i>Corynebacterium</i> sp. SCB 3003	1.95
<i>Corynebacterium</i> sp. SCB 3042	1.91
<i>Corynebacterium</i> sp. SCB 3056	2.14
<i>Corynebacterium</i> sp. SCB 3054	1.88
<i>Corynebacterium</i> sp. SCB 3073	1.85
<i>Corynebacterium</i> sp. SCB 3104	2.00
<i>Corynebacterium</i> sp. SCB 3117	1.95
<i>Corynebacterium</i> sp. SCB 3145	1.91
<i>Corynebacterium</i> sp. SCB 3153	1.96
<i>Corynebacterium</i> sp. SCB 3160	1.84
<i>Corynebacterium</i> sp. SCB 3177	1.88
<i>Corynebacterium</i> sp. SCB 3048	1.86
<i>Corynebacterium</i> sp. (亲本株)W90	1.68

- 加入 D-葡萄糖 10 mg/ml, 2, 5-DKG 处理液 (10mg/ml), 在 20 小时后补加。
- 28℃ 摇床发酵 72 小时。
- 此系复筛结果。
- D-Glucose (10mg/ml) was as a hydrogen donor for the production 2-KLG from 2, 5-DKG. 2,5-DKG (10 mg/ml) broth were fed over a period of 20h.
- Fermentations were carried out at 28℃ for 72h.
- As the results of repeating selection.

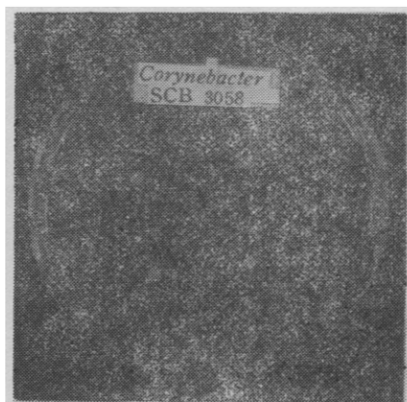


图 2 在牛肉汁固体培养基上生长的棒状杆菌 SCB 3058 菌落

Fig. 2 Colonies of *Corynebacterium* sp. SCB 3058 on Beef agar medium

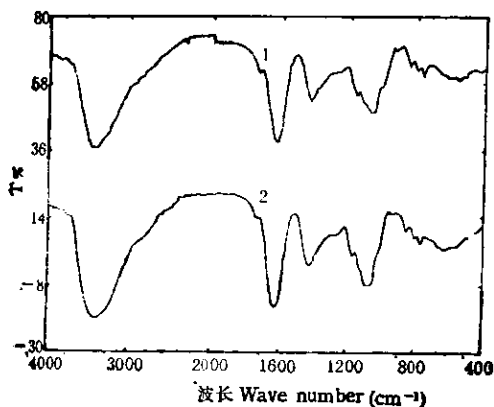


图3 2,5-DKG 红外吸收光谱 (KBr)

1. 标准品; 2. 发酵产物

Fig. 3 Infrared absorption spectrum of 2,5-DKG (KBr)

1. The standard sample;
2. The fermentation product of 2,5-DKG

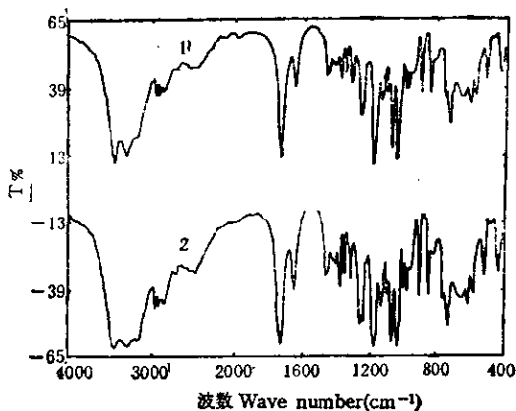


图4 2-KLG 红外吸收光谱 (KBr)

1. 标准品; 2. 发酵产物

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

1. The standard sample;
2. The fermentation product of 2-KLG

表2 2,5-DKG 和 2-KLG 发酵液提取产物元素分析

Table 2 The Elementary Analysis of the 2,5-DKG and 2-KLG Products

试样 Sample		碳 C (%)	氢 H (%)	钙 Ca (%)
2,5-DKG	发酵液提取产物测定值 The fermentation product of 2,5-DKG	10.99, 30.95	4.68, 4.67	10.75, 10.61
	计算值 (C ₈ H ₈ O, 0.5Ca 1.5H ₂ O) Calcd. for C ₈ H ₈ O, 0.5Ca 1.5H ₂ O	30.26	4.23	8.41
	标准品测定值 The Standard Sample	30.82, 30.62	4.07, 3.90	11.01, 10.95
2-KLG	发酵液提取产物测定值 The fermentation product of 2-KLG	33.85, 33.77	5.75, 5.69	/
	计算值 (C ₈ H ₁₀ O, · H ₂ O) Calcd. for C ₈ H ₁₀ O, · H ₂ O	33.97	5.66	/
	标准品测定值 The Standard Sample	33.64, 33.88	5.73, 5.70	/

洗涤,用 P₂O₅ 干燥,并放置过夜,得到土黄色粉末状物质。用水溶解后再按上述操作重复 1—2 次,可得到 2,5-DKG 粉末,用纸层析定性再次鉴别无误后,即可低温

(3—7℃)保存备用。

2. 2-KLG 的分离和提取: 将 2-KLG 发酵液静置沉降或离心除去细胞,经阳离子 [H⁺] 型 732 号或 Amberlite I. R. 120

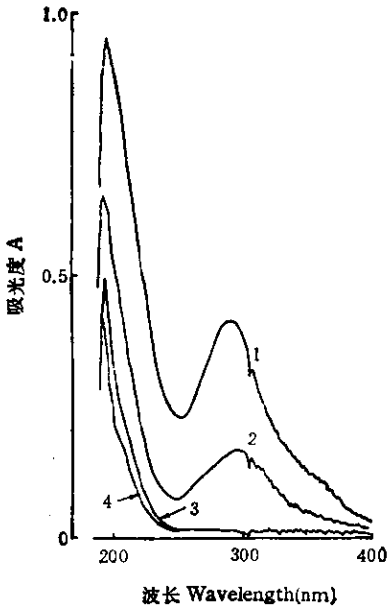


图5 2,5-DKG 和 2-KLG 紫外吸收光谱

Fig. 5 Ultraviolet absorption spectrum of 2,5-DKG and 2-KLG

1. 2,5-DKG 标准品 The standard sample of 2,5-DKG;
2. 2,5-DKG 发酵产物 The fermentation product of 2,5-DKG;
3. 2-KLG 标准品 The standard sample of 2-KLG;
4. 2-KLG 发酵产物 The fermentation product of 2-KLG

交换树脂处理后,得到 pH 2.0—2.5 的酸性溶液。加入 1% 活性炭,于 90—95℃ 保温 10 分钟后抽滤,将清液于 45℃ 减压浓缩,待冷却至 -5℃ 时,用冷乙醇洗涤成粘稠状浓缩液,离心弃去乙醇,用 P₂O₅ 干燥后可得白色粉末状结晶。纸层析定性鉴别无误后,即可用于产物鉴定。

3. 产物的鉴定:

(1) 红外吸收光谱测定: 经测定结果,所分离提取 2,5-DKG 样品和 2-KLG 样品均分别和各自的标准品相一致。如图 3 和图 4 所示。

(2) 产物的元素分析: 所获得的 2-KLG 和 2,5-DKG 产品,经元素分析,与

标准品相符合(表 2)。

(3) 熔点测定: 2,5-DKG 发酵液中分离提取的物质熔点值为 95±1℃(分解),与标准品相符合。2-KLG 熔点值为 170—171℃(微分解),与标准品相符合。

(4) 紫外吸收光谱测定: 所分离提取的 2,5-DKG 和 2-KLG 样品均分别与其标准品相一致(图 5)。

根据上述产物鉴定结果,证实了葡萄糖杆菌 SCB 611 或欧文氏菌 SCB247 利用 D-葡萄糖发酵所生成的代谢产物确系 2,5-DKG; 棒状杆菌 SCB 3058 进行第二步串联发酵所产生的代谢产物确证为合成维生素 C 的前体——2-酮基-L-古龙酸(2-KLG)。

参 考 文 献

- [1] Crawford, T. C. et al.: *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 37: 79—155, 1980.
- [2] Reichstein, T. et al.: *Helv. Chim. Acta*, 17: 311—328, 1934.
- [3] Kanzani, T. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 34: 432—436, 1970.
- [4] Sonoyama, T. et al.: *Japanese Patent*, 74, 125, 589, 1974.
- [5] Tagaki, T.: *Agric. Biol. Chem.*, 26: 719—720, 1962.
- [6] Sonoyama, T. et al.: *U. S. Patent*, 3, 922, 194, 1975.
- [7] 尹光琳等: *微生物学报*, 20: 246—251, 1980.
- [8] Lazarus, R. A. et al.: *Genetics and Molecular Biology of Industrial Microorganisms. VII. Applications of Dividing Bacteria*, p. 187—193, (Eds. by Charles L. Hershberger, Stephen W. Queener & George Hegeman), American Society of Microbiology, Washington, D. C. 1989.
- [9] Anderson, S. et al.: *Science*, 230: 144—149, 1985.
- [10] Grindley, J. F. et al.: *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 1770—1775, 1988.
- [11] Boudrant, J.: *Enzyme Microb. Technol.*, 12: 322—328, 1990.
- [12] Sonoyama, T. et al.: *U. S. Patent*, 3, 998, 697, 1976.
- [13] Kita, D. A. et al.: *U. S. Patent*, 4, 245, 649, 1981.
- [14] Sonoyama, T. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 43: 1064—1069, 1982.

[15] Nosoh, Y.: *Methods in Enzymology*, 41: 385, 1975.

STUDIES ON PRODUCTION OF VITAMIN C PRECURSOR— 2-KETO-L-GULONIC ACID FROM D-GLUCOSE BY DIRECT FERMENTATION I. SELECTION OF PRODUCING MUTANTS AND IDENTIFICATION OF ITS METABOLITES

Yin Guanglin Ma Zhifang Dong Wenling

Lin Hai Ye Qing

(Shanghai Research Center of Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai)

2-Keto-L-gulonic acid (2-KLG), the precursor for L-Ascorbic acid (Vitamin C) synthesis, was prepared directly from D-Glucose by tandem fermentation using two kinds of bacteria. *Gluconobacter* sp. SCB 611 (or a better mutant strain—*Erwinia* sp. SCB 247), which converted D-Glucose to 2,5-diketo-D-gluconate (2,5-DKG), and *Corynebacterium* sp. SCB 3058, which converted 2,5-DKG to 2-KLG, were selected through mutation.

The fermentation products, 2,5-DKG and

2-KLG, were identified by melting point, elementary analysis, UV and infrared absorption spectra respectively.

Key words

2-Keto-L-Gulonic acid (2-KLG); 2,5-diketo-D-gluconate (2,5-DKG); L-Ascorbic acid (Vitamin C); *Gluconobacter* sp.; *Erwinia* sp.; *Corynebacterium* sp.