

# 山梨糖发酵产生 2-酮基-L-古龙酸氮源代谢规律\*

李 强 刁劲羽 向波涛 曹竹安

(清华大学化学工程系 北京 100084)

**摘 要** 对山梨糖发酵产生 2-酮基-L-古龙酸氮源代谢规律进行了初步研究。通过对这一混合发酵体系蛋白和尿素代谢的研究表明,氮源代谢与单一菌体发酵相比有其特殊性,主要表现在尿素的加入有两个作用,即作为生理碱性物质调节体系 pH 和为菌体代谢提供部分氮源,而体系的蛋白含量随发酵时间的延续不断增加,其增加的原因是巨大芽孢杆菌由营养体转变成芽孢所致,这是该发酵体系的特点。本文还对该发酵体系各种氨基酸变化规律进行了讨论,将一共 17 种氨基酸按其变化规律分成了三类,较好地解释了各种氨基酸的变化情况,为进一步深入研究该体系的动力学特性提供了数据基础。

**关键词** 混合菌发酵,山梨糖,2-酮基-L-古龙酸,氮源代谢

山梨糖发酵产生 2-酮基-L-古龙酸(简称 2-KG,下同)是一个混合发酵体系,它与单一菌体发酵相比更加复杂。目前对混合菌发酵的代谢规律研究得比较少,特别是对氮源代谢规律的研究更少。近几年来有关学者开始重视混合菌代谢规律的研究,但主要限于碳源代谢。为了更加准确、全面地把握菌体的发酵规律,有必要对氮源代谢规律进行研究。山梨糖发酵产生 2-KG 是我国首先在 80 年代初发现并将其推向生产规模的技术。其目的是为了生产维生素 C(2-KG 是生产维生素 C 的原料)。目前我国生产维生素 C 原料药的企业绝大多数采用这一方法,但是从已发表的文献<sup>[1,2]</sup>看,比较全面地研究发酵全过程中各种氮源变化情况的文献还未见报道。

目前山梨糖发酵生产 2-KG 控制水平还很低,对发酵过程的内在规律还不能很好地把握,生产经验性很强,因此无论是生产的稳定性、还是发酵水平,都还不够理想。所以本文对这一发酵体系氮源代谢的研究,对揭示代谢规律,指导生产有一定的现实意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

东北制药厂提供,大菌:巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*),小菌:氧化葡萄糖酸杆菌(*Gluconobacter oxydans*),菌种编号:2980。

### 1.2 培养基

**1.2.1 种瓶培养基(%)**:山梨糖 1.0,玉米浆 1.0,酵母膏 0.2,尿素 0.1,  $\text{CaCO}_3$  0.2, pH7.0 ~ 7.2。

\* 本课题为“八五”科技攻关项目。

本文于 1994 年 9 月 28 日收到。

**1.2.2 发酵培养基:** 配方 I (%) : 山梨糖 8.0, 葡萄糖 0.5, 玉米浆 1.0, 尿素 1.2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05,  $\text{MgSO}_4$  0.01,  $\text{CaCO}_3$  0.5, pH 7.0~7.2。配方 II (%) : 玉米浆 0.5, 尿素 0.1,  $\text{MgSO}_4$  0.01,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05, 葡萄糖 0.5, 碱液 15%NaOH 适量(调 pH, 视产酸量多少, 自动加入, 保持 pH 6.5~7.0), 23%山梨糖液(流加, 视产酸速度加入, 加入总量不大于总体积 10%)。

### 1.3 培养条件

种瓶: 29~30℃, 20~24h, 装液量 80ml/300ml 瓶, 接种量 3ml/瓶, 摇床转速 180r/min。

发酵罐: 29~30℃, 30~50h, 5L 发酵罐。初始装液量 2000ml, 流加 15%NaOH 调节 pH, 流加 23%山梨糖液补充碳源。空气流量 3.0~3.5L/min, 搅拌转速 500~700r/min。

### 1.4 发酵设备

5L 计算机控制发酵系统, 能自动采集温度、pH、溶氧、空气流量、搅拌转速、尾气  $\text{O}_2$ 、尾气  $\text{CO}_2$  等参数, 而且能由计算机自动控制碱液和山梨糖液的加入量, 调节 pH 和碳源等。

### 1.5 分析方法

发酵液的消光度: 取发酵液 1ml, 加入 6mol/L 盐酸 0.5ml, 加水稀释 50 倍, 在 650nm 下测定样品的消光度, 蒸馏水为空白; 古龙酸含量: 碘量法<sup>[3]</sup>; 无机氮测定方法: 改进的凯氏定氮法; 氨基氮测定方法: 甲醛法; 蛋白测定方法: 考马斯亮兰法; 氨基酸成分分析: Beckman 6300 氨基酸分析仪。

## 2 结果和讨论

### 2.1 基本代谢曲线

生物发酵的基本代谢参数包括菌体浓度(消光度)、产物(2-KG)浓度和基质山梨糖浓度, 在批式发酵中的变化规律如图 1 所示(配方 I 条件)。由图 1 可以看出, 山梨糖浓度在发酵初期变化较慢, 在 7h 左右略有下降, 此时是快速生长期。因为菌体所能达到的浓度很低(最高菌量只有 2g 干菌/ml 左右), 虽然菌体快速繁殖, 但用于生成菌体本身的山梨糖量占总糖量的比例较小, 所以山梨糖浓度下降较慢, 7h 左右消光度(混合菌量)达到最大值, 快速生长期结束, 而此时 2-KG 的浓度很低。这说明此时体系主要的代谢过程是长菌过程。快速生长期以后, 消光度下降, 山梨糖浓度下降加快, 2-KG 浓度上升加快, 二者的变化特性相吻合。消光度下降时从镜检发现, 此时大菌开始形成芽孢, 而小菌增加比较明显, 引起消光度下降的主要原因是大菌变成了芽孢。大菌形成芽孢时体积明显变小, 有使消光度下降的作用, 虽然小菌数量从镜检看有明显的增加, 有使消光度增大的趋势, 但由于大菌营养体数量迅速下降, 总的结果是消光度下降。当发酵 17h 左右, 消光度又开始上升, 此时大菌已基本变成了芽孢(从蛋白质含量的变化可以看出), 不再对消光度的变化有大的影响, 而小菌浓度的增加使消光度上升, 小菌浓度的变化是影响消光度变化的主要因素。到了发酵后期(40h 左右), 由于山梨糖浓度降到很低的水平, 2-KG 的生成速度变慢, 最后趋于平稳。同时, 小菌开始自溶, 使总菌

量下降,消光度下降。目前还没有一种更理想的分别检测大菌营养体量、大菌芽孢量和小菌量的方法,因此,很难定量说明哪种作用在某一时刻有多大,但是由镜检的情况看,上述的影响还是很明显的。

## 2.2 无机氮源和蛋白质的代谢规律

将凯氏法的碱化条件以及加热条件减弱(加 25%碳酸钾,加热温度 80℃,通空气带氨等)使之在测定时,只将无机氮测出,而不会分解蛋白和氨基酸,测定的结果如图 2 所示(采用配方 I,无机氮浓度以 N 计),从图 2 可以看出,无机氮随发酵时间呈 S 形变化。无机氮在发酵过程中不断上升的主要原因是尿素的分解,由于在配方 I 的条件下,中和生成的 2-KG 主要是靠尿素和  $\text{CaCO}_3$ 。实验证明,当 2-KG 快速生成时, $\text{CaCO}_3$  不能快速补充中和剂  $\text{H}_2\text{CO}_3$ ,只能靠尿素的水解,图 2 中的 pH 变化曲线表明,当无机氮浓度趋于平稳时,pH 急剧下降,一直降到 5.6 左右,而此时的  $\text{CaCO}_3$  浓度大于 0.2% (固体),无机氮趋于平稳,说明尿素已经分解完毕,在有一定量固体  $\text{CaCO}_3$  存在下,pH 却又快速下降,正好说明了上述的结论。

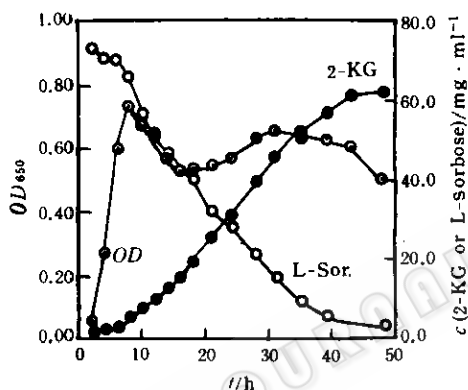


图 1 消光度、2-KG 浓度和山梨糖浓度随时间变化

Fig.1 Optical density, concentration of 2-KG and concentration of L-sorbose vs time

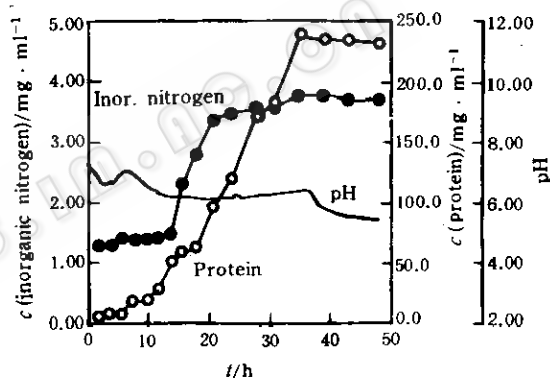


图 2 发酵过程无机氮、蛋白质浓度和 pH 随时间的变化

Fig.2 Time course of the concentrations of inorganic nitrogen, protein and pH in fermentation

那么,尿素在发酵体系中,是否只起生理中和剂的作用而不作为氮源被利用? 下面的实验结果可以说明。从培养基配方 I 可以看出尿素初始浓度为 1.2%,相当于含氮量 0.56%,假设灭菌过程中氮的损失不大,水解后含无机氮量应该不变,而实际上,发酵终了的无机氮含量只有 0.47% 左右,由此说明有 16% 左右的尿素作为氮源被利用了。所以,尿素在发酵的过程中起到了双重作用——提供氮源和调节体系 pH 作用。图 2 中的蛋白变化曲线也呈 S 形变化,发酵初期变化较慢,15h 左右有一个向上升的突变,这个突变比图 1 中消光度的峰值向后延迟了几个小时,造成这种突变的一种解释是,大菌变成芽孢释放出了细胞质中的蛋白,而芽孢的形成与蛋白质的释放并不完全同步,这个结论有待于进一步验证。蛋白质浓度在发酵过程中一直上升,这是该发酵体系的特点,蛋白质含量的多少,影响到后序处理过程的质量,如果能在不影响正常发酵的前提下,控制大菌的生长,从而控制蛋白浓度,对后处理过程,特别是除蛋白的过程将是十分有利的。

## 2.3 不同发酵工艺条件下的无机氮的变化

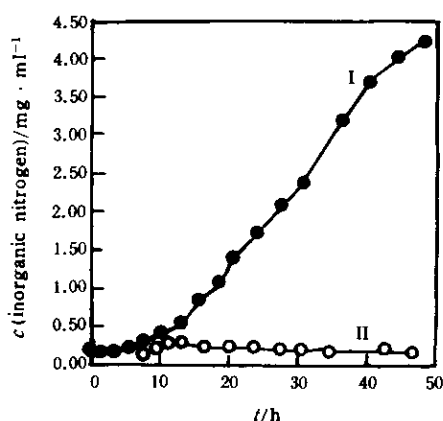


图3 两种配方条件下无机氮浓度随时间的变化

Fig.3 Time course of inorganic nitrogen concentration

## 2.4 氨基酸含量随发酵时间的变化

在该体系中,氨基酸的主要来源是玉米浆。表1显示的是体系中各种氨基酸含量随发酵时间的变化规律,从表1中可以看出该体系在发酵开始时,一共含有17种氨基酸,它们随时间的变化情况大致可以分为三组:第一组包括脯氨酸、半胱氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、精氨酸等5种,它们都在发酵初期具有一定浓度,随着发酵的进行而快速下降,到8h左右就降为0,即使是在大菌形成芽孢时也没有出现浓度的回升,这说明以上5种氨基酸主要用于蛋白质的合成,或通过氨基酸代谢途径被快速降解。第二组氨基酸包括苏氨酸、丝氨酸、甘氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、组氨酸和赖氨酸等8种,它们的共同特征是:在发酵的前8h,其浓度都降为0,持续一段时间后,其浓度由0达到某一数值,然后到了38至46h浓度再度变为0。在第一次变为0以后,不同的氨基酸经过不同的时间后,再次从0上升到某一数值,这种反复变化的一种解释是,在发酵初期,菌体快速生长,合成酶系消耗了大量氨基酸,使得溶液中氨基酸浓度降为0,到了22h左右,由于大菌营养体变成了芽孢,释放出胞液,使得氨基酸浓度上升,而后,随着小菌数量的增加,对氨基酸摄取速度加快,使得氨基酸含量再度降为0。在发酵后期,小菌也开始自溶,它的胞内物中的氨基酸随细菌的自溶而释放到溶液中,再一次引起氨基酸含量的增加。第三组氨基酸包括谷氨酸和丙氨酸,这两种氨基酸变化的特点是在整个发酵过程中,其含量一直不为0,但其变化规律与第二组相似。另外,天冬氨酸在发酵液中的含量在开始时由2nmol/ml增至78nmol/ml,而后迅速下降,这可能是由于大菌对其迅速消耗所致。从22h开始,天冬氨酸的浓度随发酵时间的增加而逐渐增大,这可能是大菌变成芽孢后释放出胞内氨基酸,而小菌对这种氨基酸利用速率较小造成的。这17种氨基酸在发酵过程中都有各自的特点,其含量对大菌和小菌的影响也不尽相同,如果在培养基优化的工作中,适当考虑这几类氨基酸的添加,对提高产酸量,提高山梨糖的转化率,将可能是十分有益的。比如在该发酵体系中,大菌的主要作用是促进小菌生长<sup>[4]</sup>,如果在不影响对小菌作用的前提下,减少第一组氨基酸的初始含量。限制大菌的生长,特别是对于象天冬氨酸,这

图3是配方I和配方II在各自的工艺条件下发酵过程中无机氮浓度随时间的变化曲线。两种配方的主要区别在于配方I中的尿素比配方II大12倍,从图3可以看出,配方II的发酵过程中无机氮明显低于配方I,这就再次证明了尿素在发酵过程中水解成无机氮的结论。同时从配方II中无机氮浓度可以看出,发酵终了的含氮量为0.02%左右,而加入的尿素量(以N计算)为0.047%,这证明了在两种配方两种工艺的条件下,尿素都有一部分作为氮源参加代谢,配方II加入尿素的主要目的是提供氮源而不是调节pH。

表 1 各种氨基酸浓度随时间的变化(单位: nmol / ml)  
Table 1 Time effect of different amino acids (Units nmol / ml)

氨基酸种类 Amino acids	发 酵 时 间 t / h														70.00
	0.2	2.08	4.03	6.05	7.95	10.00	14.00	22.00	30.00	38.00	46.00	54.00	62.00	70.00	
Pro	930.1	1003.0	915.6	618.7	171.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cys	103.3	99.27	94.40	91.55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Val	818.0	841.5	657.9	301.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Phe	375.1	356.7	186.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Arg	195.7	183.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Thr	268.6	275.2	174.5	17.33	0	0	0	21.03	14.21	0	0	0	0	0	22.21
Ser	541.7	434.5	0	0	0	0	0	41.40	37.31	19.03	26.11	57.40	84.74	151.9	327.9
Gly	628.1	679.8	645.8	559.1	0	0	0	13.82	17.58	0	17.45	121.2	198.7	327.9	0
Met	153.5	131.2	46.03	3.102	1.139	0	0	10.72	19.00	3.67	0	1.44	0	0	0
Ile	384.1	390.0	240.9	20.22	0	0	0	25.36	19.48	3.46	0	4.47	6.29	29.05	0
Leu	1265.	1191.	656.9	184.0	11.33	0	0	53.99	89.53	10.69	0	0	0	0.846	1.46
His	147.6	160.1	125.6	67.39	0	0	0	12.88	8.77	0	0	3.79	8.34	1.46	0
Lys	161.6	144.6	0	0	0	0	0	9.24	35.10	0	0	8.47	9.67	0	0
Glu	574.4	750.9	304.2	243.2	597.5	135.8	59.89	134.8	77.10	37.85	19.00	57.20	74.57	88.23	167.2
Ala	2597.	2617.	2236.	1305.	49.96	36.85	36.29	111.4	67.63	35.47	20.65	65.24	98.43	167.2	552.3
Asp	2.096	77.61	0	0	0	0	0	12.51	48.63	87.74	140.1	301.2	440.8	552.3	0
Tyr	210.9	208.0	116.5	0	35.23	0	0	42.25	24.89	0	0	0	0	0	0

种小菌利用较少(甚至不利用)的氨基酸的限量加入,对于大菌的生长将能起到限制作用。从另一个角度上讲,如果在小菌生长旺盛,特别是在小菌快速生长期,氨基酸浓度很低,甚至为 0 的时候,补加或流加相应的氨基酸,对促进小菌的生长,加快产 2-KG 的速率,缩短发酵周期,提高产酸浓度将可能有较好的效果。由于这一混合发酵体系非常复杂,大、小菌的作用机理还不完全清楚,调节发酵过程中各种氨基酸的比例和浓度,是否能达到更好的发酵结果,有待于进一步的验证。

由以上分析可以得到结论:①大菌对消光度的影响很大,大菌转变成芽孢的速度决定了消光度的变化速度。②尿素在发酵过程中的作用有两个,一是水解调节 pH,二是作为氮源被菌体利用。③该体系的蛋白含量随时间上升,蛋白含量的增加主要是因为大菌变成芽孢所致。④体系中氨基酸按其变化规律可以分成三大类,其变化规律与混合菌体的生长规律相吻合。

### 参 考 文 献

- [1] 尹光琳,陶增鑫,于龙华,等.微生物学报,1980,20(3):246~251.
- [2] 严自正,陶增鑫,于龙华,等.微生物学报,1981,21(2):185~191.
- [3] 程茉莉,严杏珍.医药工业,1981,6:15~18.
- [4] 魏东芝,袁渭康,尹光琳,等.生物工程学报,1992,8(3):277~282.

## STUDIES ON METABOLISM OF NITROGEN SOURCE IN FERMENTATION OF 2-KETO-L-GULONIC ACID

Li Qiang Diao Jinyu Xiang Botao Cao Zhuan

(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084)

**Abstract** The metabolism of nitrogen source was studied preliminarily in the fermentation of 2-keto-L-gulonic acid from sorbose. The study of this mixed population system is different from those of pure fermentation system. The addition of urea has two functions: to adjust pH as a physiological material and to provide nitrogen for the cell growth partially. The content of protein increases with fermentation time, the reason of this is due to the change of *Bacillus megaterium* from vegetative state into gemma, which is a feature of this system. The change of the concentrations of different amino acids is discussed, the changes of seventeen amino acids are divided into three categories, which has been explained qualitatively. This study sets a base for further study of the kinetics of the system.

**Key words** Mixed fermentation, L-sorbose, 2-KG, Metabolism of nitrogen source