

维生素C二步发酵新菌系发酵条件优化

高明¹, 吕淑霞^{1,*}, 靳亚楠¹, 徐婷婷¹, 黄磊², 张忠泽³

(1. 沈阳农业大学生物科学技术学院, 辽宁沈阳 110866;

2. 辽宁省农业科学院蔬菜研究所, 辽宁沈阳 110161;

3. 中国科学院沈阳应用生态研究所, 辽宁沈阳 110016)

摘要: 维生素C二步发酵法中糖酸转化过程是由产酸菌(氧化葡萄糖酸杆菌)及伴生菌(枯草芽孢杆菌)混合发酵完成。为更好地促进产酸菌与伴生菌之间的协调,使其达到最佳状态,采用正交设计以及单因素实验相结合的方法对营养条件及发酵培养条件进行优化。获得的优化结果为:L-山梨糖8%,玉米浆1.4%,尿素1.2%,碳酸钙0.5%,硫酸镁0.02%;装液量为10mL/100mL,培养温度为29℃,接种量为15%。优化后的混合菌系2-KGA产量提高2.45%,60h达到发酵终点,比优化前缩短16h,发酵效率提高0.29g/L·h。

关键词: 维生素C二步发酵法, 2-酮基-L-古龙酸, 枯草芽孢杆菌A9, 正交设计

Optimization of fermentation conditions for two-step fermentation of vitamin C

GAO Ming¹, LV Shu-xia^{1,*}, JIN Ya-nan¹, XU Ting-ting¹, HUANG Lei², ZHANG Zhong-ze³

(1. College of Bioscience and Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China;

2. Institute of Vegetable, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang 110161, China;

3. Institute of Applied Ecology, Academia Sinica, Shenyang 110016, China)

Abstract: The conversion process from L-sorbose to 2-keto-L-gulonic acid in vitamin C two-step fermentation was mixed culture fermentation by acid-producing strain (*Gluconobacter oxydans*) and companion bacterium (*Bacillus subtilis*). In order to promote the coordination between the two strains and make it reach the best state, the nutrient condition and the culture conditions were researched by orthogonal test and single factor experiment. The result showed that the optimal conditions were as follows: 8% L-sorbose, 1.4% corn steep liquor, 1.2% urea, 0.5% CaCO₃, 0.02% MgSO₄, liquid volume in 100mL flask with 10mL, culture temperature 29°C, inoculation amount 15%. The yield of 2-KGA increased by 2.45% under the optimized culture medium conditions compared with the original medium. It reached the fermentation end after 60h which was shorten by 16h than before and the fermentation efficiency improved by 0.29g/L·h.

Key words: two-step fermentation of vitamin C; 2-keto-L-gulonic acid; *Bacillus subtilis* of A9; orthogonal design

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)14-0235-04

维生素C是一种人体所必需的重要维生素,被广泛应用于食品、制药、化妆品、饲料、饮料、生物试剂等行业^[1]。二步发酵法^[2]生产维生素C是我国自主研发的生物发酵法,由于其工艺简单,无有毒有害物质的使用,对环境污染小,因而具有巨大的优势,引起世界各国的关注。其特殊优势在于第二步糖酸转化,不同于莱氏法^[3]的化学转化,二步发酵法采用混合菌发酵,其中产酸菌为氧化葡萄糖酸杆菌,俗称小菌,单独存在时转化率较低;伴生菌为芽孢杆菌,俗称大菌,不具备产酸功效,但可促进前者的生长及产酸^[4]。目前

经研究发现多种菌种均可作为伴生菌,如苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)^[5]、掷孢酵母(*Sporobolomyces roseu*)^[6]、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)^[7]、条纹假单胞菌(*Pseudomonas striata*)^[2]、软化芽孢杆菌(*Bacillus macerans*)^[8]等。2-酮基-L-古龙酸(2-KGA)是V_C生产前体,为提高糖酸转化率,进而提高2-KGA产量,各国科学家进行了多种研究^[9],优良菌系的筛选以及发酵条件的优化是提高糖酸转化率及2-KGA产量的重要保证。枯草芽孢杆菌A9筛选自新鲜牛奶,经研究发现其有很好的伴生能力,可以有效地提高2-KGA产量并且促使发酵终点提前,不仅可以降低成本还可以提高生产效率,具有很大的应用前景。为提高新菌系的发酵效率,更好地促进产酸菌与伴生菌之间的协调,使其达到最佳状态,本工作分别采用正交实验设计以及单因素实验方法,对新菌系发酵培养基中的主要营养成分分配比及培养条件进行优化。

收稿日期: 2012-02-22 * 通讯联系人

作者简介: 高明(1986-),女,硕士研究生,研究方向:微生物生物化学与分子生物学。

基金项目: 沈阳市科技计划项目(F10-205-1-55);沈阳农业大学NSFC启动基金资助项目(20102002)。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

氧化葡萄糖酸杆菌 (*Gluconobacter oxydans*, G.o)、巨大芽孢杆菌 2980 (*Bacillus megaterium* 2980, B.m 2980) 东北制药总厂提供; 枯草芽孢杆菌 A9 (*Bacillus subtilis* A9, B.s A9) 本实验室筛选并保藏; 玉米浆 华北制药康欣有限公司; 牛血清白蛋白、蛋白胨、酵母膏、牛肉膏 北京奥博星生物技术责任有限公司; 琼脂 北京陆桥技术有限公司; 山梨糖 东北制药总厂; 尿素、葡萄糖、硫酸镁、碘化钾、碳酸钙 国药集团化学试剂有限公司; 磷酸二氢钾、浓硫酸、磷酸 沈阳化学试剂厂; 95%乙醇 沈阳沈一精细化学品有限公司; 可溶性淀粉 四川省彭州市军乐化工厂; 碘 河北省保定化学试剂厂; 培养基斜面培养基 (%) 山梨糖 0.5、蛋白胨 1.0、玉米浆 0.5、酵母膏 0.3、牛肉膏 0.3、MgSO₄ 0.02、琼脂 2.5; 种子培养基 (%) 山梨糖 2.0、葡萄糖 0.2、尿素 0.1、玉米浆 0.5、碳酸钙 0.1; 发酵培养基 (%) 山梨糖 8.0、玉米浆 1.0、尿素 1.2、KH₂PO₄ 0.1、MgSO₄ 0.02、碳酸钙 0.5; 以上培养基均用 1mol/L NaOH 调节 pH 至 6.7~7.0, 121℃ 灭菌 25min; L-山梨糖与其他组分分开灭菌。

电子天平 北京赛多利斯仪器系统有限公司; LDZX 型立式压力蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械厂; 数显恒温水浴锅 江苏国华电器有限公司; HZP-250 型全温振荡培养箱 上海精宏实验设备有限公司; 超净工作台 苏州苏净集团安泰公司; UB-7 型 pH 计 北京丹佛仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种培养

1.2.1.1 培养方法 种子培养: 分别挑取大菌、小菌到无菌水中, 然后挑一环大菌悬液于小菌悬液中, 摇匀制成大小菌混悬液。用灭过菌的接种环蘸取一环菌混悬液于空白培养过的试管斜面上划线, 如此反复 15~20 次, 直至斜面表面湿润。倒置培养 2~3d。取斜面培养菌接种于种子培养基中, 培养 24h; 发酵培养: 将培养好的种液按 10% 的接种量转接至发酵培养基中, 培养 48h, 测其 2-KGA 产量。

1.2.1.2 培养条件 温度 29℃、摇床转速 180r/min。

1.2.2 营养条件优化 选取 L-山梨糖、尿素、玉米浆、碳酸钙、硫酸镁含量为实验因素, 以 2-KGA 产量为实验指标, 按照 L₁₆(4⁵) 设计正交实验见表 1。

表 1 正交设计因素水平表

Table 1 The factor level of orthogonal design

水平	因素				
	A L-山梨糖量 (%)	B 玉米浆量 (%)	C 尿素量 (%)	D 硫酸镁量 (%)	E 碳酸钙量 (%)
1	7	1.2	0.8	0.01	0.1
2	8	1.4	1.0	0.02	0.3
3	9	1.6	1.2	0.05	0.5
4	10	1.8	1.4	0.1	0.7

1.2.3 发酵培养条件优化 通过单因素实验分别对混菌发酵过程中不同初始 pH、装液量、接种量、温度

条件进行优化。

1.2.4 测定方法 2-酮基-L-古龙酸测定: 碘量法^[10]; 菌浓度测定: 浊度法 (OD_{650nm}); pH 测定: pH 计。

2 结果与分析

2.1 营养条件优化

根据正交实验方案进行 16 组实验, 每组 3 次重复, 取 2-酮基-L-古龙酸产量平均值进行分析。数据见表 2。

表 2 V_C 二步发酵培养基正交设计表及结果

Table 2 Orthogonal design and results of fermentation medium of vitamin C two-step fermentation

实验号	A	B	C	D	E	2-KGA 产量 (g/L)
1	1	1	1	1	1	46.18
2	1	2	2	2	2	59.25
3	1	3	3	3	3	59.53
4	1	4	4	4	4	55.35
5	2	1	2	3	4	52.87
6	2	2	1	4	3	62.76
7	2	3	4	1	2	63.00
8	2	4	3	2	1	63.80
9	3	1	3	4	2	53.12
10	3	2	4	3	1	63.05
11	3	3	1	2	4	62.87
12	3	4	2	1	3	62.94
13	4	1	4	2	3	53.53
14	4	2	3	1	4	63.84
15	4	3	2	4	1	59.57
16	4	4	1	3	2	59.20
k ₁	55.078	51.425	57.752	58.990	58.150	
k ₂	60.608	62.225	58.657	59.862	58.642	
k ₃	60.495	61.242	60.072	58.662	59.690	
k ₄	59.035	60.323	58.732	57.700	58.733	
R	5.530	10.800	2.320	2.162	1.540	

表 3 方差分析表

Table 3 The variance analysis

因素	偏差平方和	自由度	F	F _{0.05}	显著性
A	80.209	3	0.994	3.290	
B	297.620	3	3.689	3.290	*
C	10.965	3	0.136	3.290	
D	9.575	3	0.119	3.290	
E	4.976	3	0.062	3.290	
误差	403.34	15			

根据表 2 的极差可以看出, 各影响因素对 V_C 生产前体 2-酮基-L-古龙酸产量的影响程度为: 玉米浆 > L-山梨糖 > 尿素 > 硫酸镁 > 碳酸钙。由表 3 方差分析可知, 玉米浆含量对 2-KGA 产量影响显著 ($\alpha=0.05$), 其他因素均不显著。有研究人员对玉米浆成分进行深入分析, 可知玉米浆中含有多种氨基酸, 可提供多种营养物质供菌体生长, 对 2-KGA 产量具有重要影响^[11]; L-山梨糖是生产 2-KGA 的底物, 在发酵过程中初始高浓度 L-山梨糖会抑制 2-KGA 的生成, 有研究指出通过间歇流加 L-山梨糖, 可以解除高浓度糖对菌系发酵生成 2-KGA 的抑制作用, 提高 2-KGA 的收率^[12]。尿素在微生物生长过程中不仅作为氮源, 而且也作为

一种生理碱调节微生物生长的pH环境^[13]。据报道,2-KGA在还原酶作用下生成L-艾杜糖酸,推测高浓度MgSO₄激活了2-KGA还原酶,使2-KGA进一步还原成L-艾杜糖酸,使得2-KGA的得率下降^[14],本实验中也显示同样结果。优化后的培养基为A₂B₂C₃D₂E₃,即L-山梨糖8%、玉米浆1.4%、尿素1.2%、硫酸镁0.02%、碳酸钙0.5%,经过验证实验可以得出2-KGA产量为66.8g/L。

2.2 发酵培养条件优化

2.2.1 初始pH条件优化 从图1可以看出,灭菌后pH为7.3左右时,菌体的产酸达到最高值,低于或高于该值时,菌系的2-KGA产量都稍低,这是由于高的pH会对菌体的生长产生抑制作用,不利于菌系产酸;而低的pH不利于中和菌系生长过程中的酸,导致菌液中的pH过低,也不利于伴生菌的生长。因此选择的最优pH为7.0~7.3,即灭菌前pH为6.7左右。适宜的pH可以使两菌的关系达到最佳的协调状态,是提高2-酮基-L-古龙酸产量的关键。

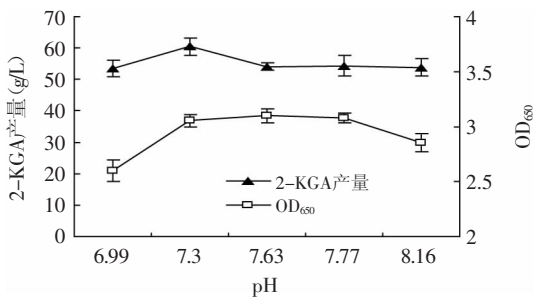


图1 初始pH对新菌株G.o+A9中2-KGA产量的影响

Fig.1 Effect of initial pH on 2-KGA production by new strains of G.o+A9

2.2.2 装液量条件优化 从图2可以看出,在100mL发酵摇瓶中装液量为10mL时即可充分满足菌体的生长要求,装液量过少不能满足菌体的营养需求,过多则会阻碍菌体的代谢活力。枯草芽孢杆菌和氧化葡萄糖酸杆菌均为好氧菌,其生长代谢是一个消耗氧的过程,因此对装液量有一定的要求,装液量是影响V_c二步发酵的关键因素之一。

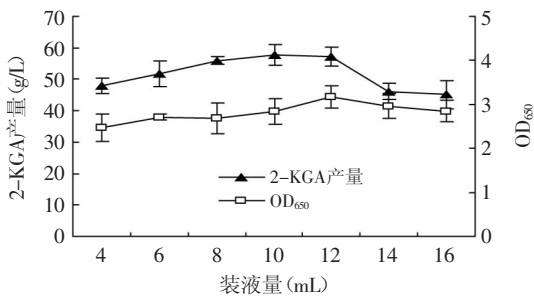


图2 装液量对对新菌株G.o+A9中2-KGA产量的影响

Fig.2 Effect of liquid volume on 2-KGA production by new strains of G.o+A9

2.2.3 接种量条件优化 从图3可以看出,菌浓度对菌系产酸起着重要的作用,为保证菌种更好地发挥其功能,控制接种量尤其重要。实验发现接种量为15%时,2-KGA产量最高,之后随着其接种量的提高,2-

KGA产量下降,这是由于培养基中的营养成分不足以满足菌体的生长,因而选择的最优接种量为15%。

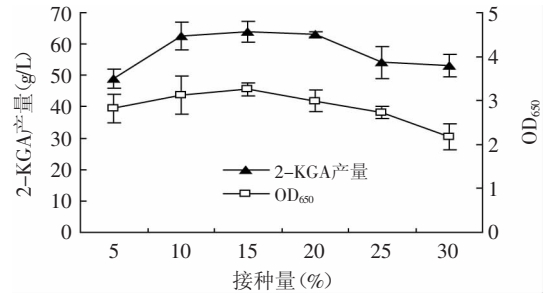


图3 接种量对新菌株G.o+A9中2-KGA产量的影响

Fig.3 Effect of inoculation amount on 2-KGA production by new strains of G.o+A9

2.2.4 温度条件优化 从图4可以看出,29℃产酸效果最好,温度低于25℃,伴生菌生长过慢,高于29℃抑制了产酸菌的生长。因此选择的最佳培养温度为29℃。

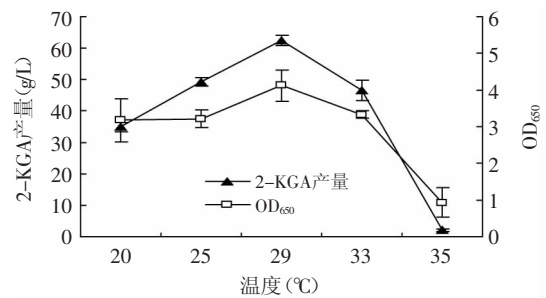


图4 温度对新菌株G.o+A9中2-KGA产量的影响

Fig.4 Effect of temperature on 2-KGA production by new strains of G.o+A9

2.3 新菌株优化前后与工业生产菌系发酵2-KGA产量对比

由图5可知,发酵条件优化后的新菌株2-KGA产量明显高于优化前,并且优化后发酵终点提前。终点2-KGA产量为75.12g/L,比优化前终点2-KGA产量提高2.45%;优化后60h左右达到发酵终点,比优化前终点76h缩短16h,发酵效率提高了0.29g/L·h。但是随着发酵时间的延长,既当菌群浓度增加到一定程度时,2-KGA产量不再提高,呈稳定状态。

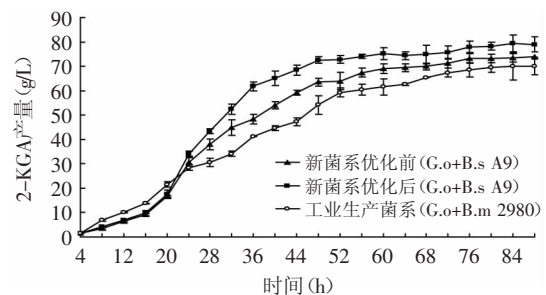


图5 新菌株优化前后与工业生产菌系发酵2-KGA产量比较

Fig.5 Comparison of 2-KGA production by the new strains before and after optimization and the industrial fermentation strains

3 结论

通过比较目前生产用菌巨大芽孢杆菌2980与本实验室筛选出来的枯草芽孢杆菌A9促氧化葡萄糖酸

杆菌生长及产酸能力,发现枯草芽孢杆菌A9作为伴生菌可提高2-KGA产量并且缩短发酵时间。为发挥新菌系的发酵潜力,进而研究营养成分及培养条件对新菌系生长产酸的影响,旨在提高其2-KGA产量及发酵效率。最终确定最优发酵培养基为:L-山梨糖8%、玉米浆1.4%、尿素1.2%、MgSO₄ 0.02%、碳酸钙0.5%;最优培养条件为:pH7.0~7.3、100mL发酵摇瓶装液量为10mL、温度29℃、接种量15%。通过实验证明:优化后的混合菌系2-KGA产量提高2.45%,60h达到发酵终点,比优化前缩短16h,发酵效率提高0.29g/L·h。优化后的培养条件不仅降低了成本,还提高了生产效率,这对指导V_c工业生产具有重大意义。

参考文献

- [1] 张静,刘立明,刘杰,等. 生物技术法生产维生素C的研究进展[J]. 食品与生物技术学报,2008,27(5):1-7.
- [2] 尹光琳,陶增,鑫于龙,等. 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[J]. 微生物学报,1980,20(3):246-251.
- [3] T. Reichstein, A. Grüssner. Eine ergiebige Synthese der l-Ascorbinsäure(C-Vitamin)[J]. Helvetica Chimica Acta,1934,17(1):311-328.
- [4] Zhang Jing, Liu Jie, Shi Zhong-ping. Manipulation of *B. megaterium* growth for efficient 2-KLG production by *K. vulgare* [J]. Process Biochemistry,2010,45:602-606.

- [5] 康艳红,赵军,杨伟超,等. V_c二步发酵新组合菌系B15-14的筛选及其条件优化[J]. 微生物学杂志,2008,28(4):35-38.
- [6] 仲崇斌,张忠泽,张文革,等. 以掷孢酵母作为伴生菌产生V_c前体KGA的研究[J]. 生物技术,2004,14(1):45-47.
- [7] 杨伟超,汲涌,荆士华,等. 一种V_c二步发酵伴生菌的初筛方法[J]. 生物技术,2009,19(6):51-53.
- [8] 盛勤,冯瑞山,陈建. 氧化葡萄糖酸杆菌及其伴生菌软化芽孢杆菌原生质体融合的研究[J]. 中国药科大学学报,1996,27(10):618-620.
- [9] Takagi Y, Sugisawa T, Hoshino T. Continuous 2-keto-L-gulonic acid fermentation from L-sorbose by *Ketogulonigenium vulgare* DSM 4025[J]. Appl Microbiol Biotechnol,2009,82:1049-1056.
- [10] 蒋宇扬,郭振勇,张成刚. 2-酮基-L-古龙酸还原酶分离纯化及其理化、酶学性质的研究[J]. 生物工程学报,1997,13(4):400-405.
- [11] Zhang Jing, Zhou Jing-wen, Liu Jie, et al. Development of chemically defined media supporting high cell density growth of *Ketogulonigenium vulgare* and *Bacillus megaterium* [J]. Bioresource Technology,2011,102:4807-4814.
- [12] 杨丽宁,赵士豪,刘冲. 间歇流加L-山梨糖发酵生产2-酮基-L-古龙酸研究[J]. 河北化工,2008,31(6):33-35.
- [13] 李强,刁劲羽,向波涛. 山梨糖发酵产生2-酮基-L-古龙酸氮源代谢规律[J]. 微生物学报,1996,36(1):19-24.
- [14] 杨涛,朱欣杰,张志雄,等. MgSO₄对2-酮基-L-古龙酸发酵影响的实验研究[J]. 上海交通大学学报,2008,42(9):1458-1465.

(上接第230页)

55℃,加酶量1.5%,酶解pH7.5。在此条件下酶解提取2h,河蚬多糖的提取率最高为4.53%。

参考文献

- [1] 姚静倩,吴皓,陈蕾,等. 双壳贝类软体部位活性物质研究概况[J]. 中国中医药信息杂志,2008,15(10):98-100.
- [2] 王俊,姚滢,张建鹏,等. 牡蛎多糖的制备和生物学活性研究[J]. 医学研究生学报,2006,19(6):217-220.
- [3] 尹华,袁强,储云月. 文蛤多糖的提取及含量测定[J]. 中国海洋药物,2006,25(1):48-51.

(上接第234页)

- [6] Wang Lijun, MasayoshiSAITO, Eizo TATSUMI, et al. Antioxidative and angiotensin I-Converting enzyme inhibitory activities of sufu(fermented tofu) extracts[J]. JARQ,37(2):129-132.
- [7] A Fahmi,S Morinura,H C Guo,et al. Production of angiotensin I-Converting enzyme inhibitory peptides from sea bream scales [J]. Process Biochemistry,2004,39:1195-1200.
- [8] 郝征红,李桂凤,祁国栋,等. 大豆功能性成分的价值综述[J]. 中国食物与营养,1998(2):9-30.
- [9] 张岩春,于国萍. 酶法有机溶剂萃取大豆油的综述[J]. 粮油食品科技,2004,12(3):31-32.
- [10] 洪丰,朱向菊. 酶法提油技术应用[J]. 粮食与油脂,2009(6):1-3.
- [11] 鲁曾,董海洲,潘燕. 酶法提油技术研究进展[J]. 粮食与油脂,2006(6):37-39.

- [4] 沈鸿,窦昌贵. 河蚌多糖提取工艺的优化[J]. 时珍国医国药,2006,17(3):380-381.
- [5] 张延坤,张东祥. 浅谈生物活性多糖的抗病作用与临床应用[J]. 中国现代实用医学杂志,2008,7(5):35-39.
- [6] 汪财生,孙安吉,王忠华,等. 紫山药多糖酶法提取工艺优化研究[J]. 食品工业科技,2010,31(2):266-271.
- [7] 邹伟,张宝善,李冰,等. 水浴振荡辅助酶法提取双孢蘑菇多糖的工艺研究[J]. 食品工业科技,2011,32(5):223-224,334.
- [8] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 第二版. 杭州:浙江大学出版社,1999.

- [12] 吴祥庭. 酶法提油技术的研究进展[J]. 粮油食品科技,2006,14(6):41-42.
- [13] Dobush G R, Ankney C D, Kremetz D G. The effect of apparatus,extraction time,and solvent type on lipid extractions of snow geese[J]. Can J Zool,1985,63:1917-1920.
- [14] 尚军,李来好,吴燕燕,等. 响应面法优化超声波辅助蛋白酶水解合浦珠母贝肉的条件研究[J]. 食品科学,2009,30(18):44-49.
- [15] 张智,朱洪亮,钮宏禹,等. 响应面法优化枯草芽孢杆菌产蛋白酶的发酵条件[J]. 食品科学,2008,2(12):400-404.
- [16] van der VEN C, GRUPPEN H, de BONT D B A, et al. Optimization of the angiotensin converting enzyme inhibition by whey protein hydrolysates using response surface methodology[J]. International Dairy Journal,2002,12(10):813-820.