

文章编号:1673-1689(2010)01-0139-06

# 金属离子促进 *Gluconobacter oxydans* 高效 合成 2-酮基-L-古龙酸

纪凯<sup>1</sup>, 刘杰<sup>2</sup>, 秦苏东<sup>2</sup>, 刘立明<sup>\*1</sup>, 陈坚<sup>1</sup>

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室; 2. 江苏江山制药有限公司, 江苏 靖江 214500)

**摘要:** 根据 *Gluconobacter oxydans* 合成 2-酮基-L-古龙酸(2-KLG) 代谢途径采用单因素实验研究了 6 种金属离子对细胞生长和 2-KLG 的影响, 在此基础上, 对促进细胞生长或产酸的  $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$  建立多元二次方程模型, 得到上述 3 种金属元素的最佳浓度为  $Fe^{3+}$  0.21 mmol/L,  $Mn^{2+}$  9.98 mmol/L 和  $Mg^{2+}$  4.23 mmol/L。在这一最优组合下, 2-KLG 产量达到 65.1 g/L, 与优化前比较, 提高了 144.4%。

**关键词:** *Gluconobacter oxydans*; 金属离子; 2-酮基-L-古龙酸

中图分类号: S 567

文献标识码: A

## Enhancement of 2-keto-L-gulonic production in *Gluconobacter oxydans* Through Feeding Metalions

JI Kai<sup>1</sup>, LIU Jie<sup>2</sup>, QING Su-dong<sup>2</sup>, LIU Li-ming<sup>\*1</sup>, CHEN Jian<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Jiangsu Jiangshan Pharmaceutical Co., Ltd. Jingjiang 214500, China)

**Abstract:** To further increase the production of 2-keto-L-gulonic acid by *Gluconobacter oxydans*, the effects of six different metal ions were determined, based on the analysis of L-Sorboseone pathway. It was found that  $Fe^{3+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  can enhance the cell growth and 2-KLG production. Then, an optimum concentration of those three metal ions was achieved by developing a multivariate quadratic equation:  $Fe^{3+}$  0.21 mmol/L,  $Mn^{2+}$  9.98 mmol/L, and  $Mg^{2+}$  4.23 mmol/L. By using the optimum combination, the production of 2-keto-L-gulonic reached at 65.1 g/L, which is 144.4% higher than that of the control.

**Key words:** *Gluconobacter oxydans*, metal ions, 2-keto-L-gulonic

维生素 C 是人体必需的营养元素之一, 广泛应用于医药、食品、饲料及化妆品中。由国内开发的维生素 C“二步工艺”是目前维生素 C 生产方法中应用最广和最具吸引力的工艺之一<sup>[1]</sup>。维生素 C

二步发酵工艺采用 *G. oxydans* 和 *B. megaterium* 为生产菌株, 催化 L-山梨糖为 2-酮基-L-古龙酸(2-KLG)。在这一过程中, L-山梨糖脱氢酶(SDH)和 L-山梨酮脱氢酶(SNDH)是催化这一转化的关键

收稿日期: 2008-07-10

基金项目: 国家 863 计划项目(2006AA020303); 国家“十一五”科技支撑计划项目(2007BAI46B02)。

\*通讯作者: 刘立明(1976-), 男, 安徽宿州人, 工学博士, 副教授, 主要从事微生物细胞生理功能工程研究。

Email: mingli@jiangnan.edu.cn

酶。Sugisawa<sup>[2]</sup>在前期研究中发现,一定浓度的 $\text{Fe}^{3+}$ 和 $\text{Mg}^{2+}$ 和 $\text{Ca}^{2+}$ 能分别有效提高SDH和SNDH的活性,但 $\text{Cu}^{2+}$ 则抑制SNDH活性(图1)。培养基中过量的 $\text{Cu}^{2+}$ 导致发酵过程中 $B. megaterium$ 自溶,从而影响 $G. oxydans$ 发酵生产2-KLG的产量<sup>[3]</sup>,而添加 $\text{Mg}^{2+}$ 和 $\text{Mn}^{2+}$ 则能有效抑制这一现象<sup>[4]</sup>。

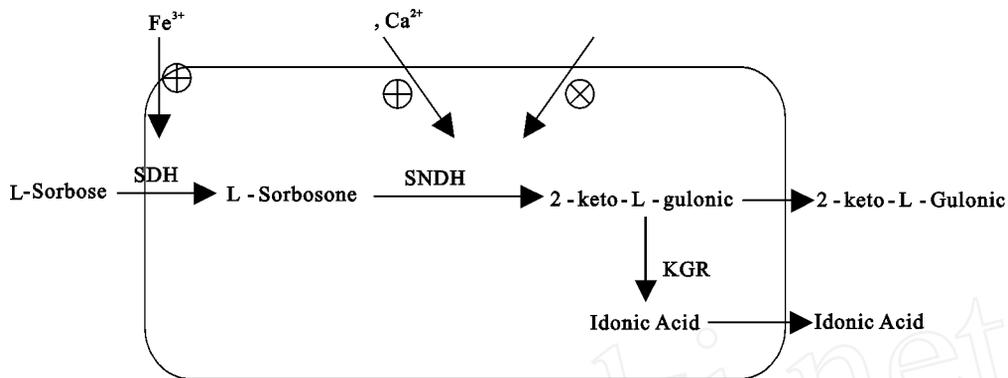


图1 氧化葡萄糖酸杆菌中2-酮基-L-古龙酸代谢途径

Fig.1 The metabolic pathway of 2-keto-L-gulonic in *Gluconobacter oxydans*

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

*Gluconobacter oxydans* (小菌), *Bacillus megaterium* (大菌)。

### 1.2 培养基

种子培养基:L-山梨糖 2.0%(单独灭菌)、牛肉膏 0.3%、玉米浆 0.15%、尿素 0.1%、氯化钙 0.1%、氯化镁 0.02%、磷酸二氢钾 0.1%;pH值 6.7,121 灭菌 15 min。

发酵培养基:L-山梨糖 8.0%(单独灭菌)、玉米浆 0.2%、尿素 1.0%、氯化钙 0.5%、磷酸氢二钾 0.1%;pH值 7.0,121 灭菌 15 min。

### 1.3 培养方法

*G. oxydans* 种子培养:750 mL 三角瓶装液量 75 mL,吸取 0.5 mL 甘油菌悬液于三角瓶中,控制初始 pH 值 6.8,30 ,200 r/min 振荡培养 32 h。

*B. megaterium* 种子培养:750 mL 三角瓶装液量 75 mL,吸取 0.5 mL 甘油菌悬液于三角瓶中,控制初始 pH 6.8,30 ,200 r/min 振荡培养 8~9 h。

发酵培养:750 mL 三角瓶装液量 75 mL,*B. megaterium* 接种量为体积分数 5%,控制初始 pH 6.8~7.0,30 ,200 r/min 振荡培养菌体至稳定期接入 *G. oxydans* 种子培养液,接种量为体积分数 5%,继续培养 72 h。每个样品做 3 个平行样。

本研究在分析不同金属离子对 *G. oxydans* 代谢途径影响的基础上,采用单因素实验考察了 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 和 $\text{Zn}^{2+}$ 6种金属离子对2-KLG发酵的影响,选取对细胞生长和产酸有显著影响的3种离子( $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ ),通过建立数学模型<sup>[5-6]</sup>,从而得到3种金属离子的最佳组合,促进2-KLG产量的提高。

### 1.4 分析方法

1.4.1 2-KLG浓度的测定:改进的碘量法<sup>[7]</sup> 取样品 2 mL 于 10 mL 比色管中,加入 2 mL 7 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,100 条件下水浴 30 min,洗入 500 mL 的三角瓶,加 4~5 滴 0.1 mol/L 的淀粉溶液作为指示剂,用 0.1 mol/L 的标准碘液滴定至蓝色为终点。2-KLG的含量(mg/mL) = 7.6916 × 耗氧量(mL)。

1.4.2 山梨糖浓度的测定 蒽酮硫酸法<sup>[8]</sup>。

1.4.3 菌体干重测定 取 10 mL 发酵液于 50 mL 离心管中,2000 r/min 离心 10 min 沉淀大菌与杂质,加入 1 mol/L 稀盐酸洗涤沉淀两次。上清液倒入另一 50 mL 离心管,10000 r/min 离心 20 min,倾去上清液,80 烘干至恒重后称重。

### 1.5 响应面法实验设计

根据单因素实验选取对菌体生长和 2-KLG 产量有重要影响的 3 种金属离子 ( $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ ),采用 3 因素 3 水平的 Box-Behnken 中心组合实验设计,对这 3 种金属离子重新编码和进行水平标注(表 2)。表 3 列出了 Box-Behnken 实验设计下 *B. megaterium* 和 *G. oxydans* 混合培养生成 2-KLG 的情况,其中第 13-15 次实验为 3 次重复的中心点实验,用于考察模型的误差。实验中各模型通过最小二乘法拟合二次多项方程可表达为:  $Y = \mu_0 + \mu_1 x_1 + \mu_2 x_2 + \mu_3 x_3 + \mu_{11} x_1^2 + \mu_{22} x_2^2 + \mu_{33} x_3^2 + \mu_{12} x_1 x_2 + \mu_{13} x_1 x_3 + \mu_{23} x_2 x_3$  (1),  $Y$  为响应值(2-KLG合成量),  $\mu_0$  为常数项,  $\mu_i$ 、 $\mu_{ij}$ 、 $\mu_{ii}$  为回归系数,  $x_i$ 、 $x_j$  ( $i = 1, 2, 3; j = 1, 2, 3; i \neq j$ ) 为自变量编

码值。多项式模型方程拟合的性质由确定系数  $R^2$  表达,其统计学上的显著性由  $F$  值检验,采用 SAS 典型性分析预测生物合成 2- KL G 的最大值以及获得最大值的条件。

## 2 结果与讨论

### 2.1 金属离子对 2- KL G 发酵的影响

6 种金属离子 ( $Fe^{3+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$  和  $Zn^{2+}$ ) 对 2- KL G 合成的影响如图 2 所示,对 *G. oxydans* 和 *B. megaterium* 生长的影响如图 3 所示。与未添加金属离子的对照组比较,添加  $Fe^{3+}$  (0.25 mmol/L)、 $Mg^{2+}$  (8.3 mmol/L)、 $Mn^{2+}$  (13.25 mmol/L) 能有效地提高 2- KL G 的产量。当添加 0.25 mmol/L  $Fe^{3+}$ 、8.3 mmol/L  $Mg^{2+}$ 、13.25 mmol/L  $Mn^{2+}$  时,2- KL G 产量提高了 22.3%、39.4%、63.6%。然而,在培养基中添加一定量的  $Cu^{2+}$  或  $Zn^{2+}$  则明显抑制细胞生长和降低 2- KL G 产量。 $Ni^{2+}$  虽然在一定程度上促进了大菌细胞生长,但 2- KL G 产量仅为对照组的 49.4%。

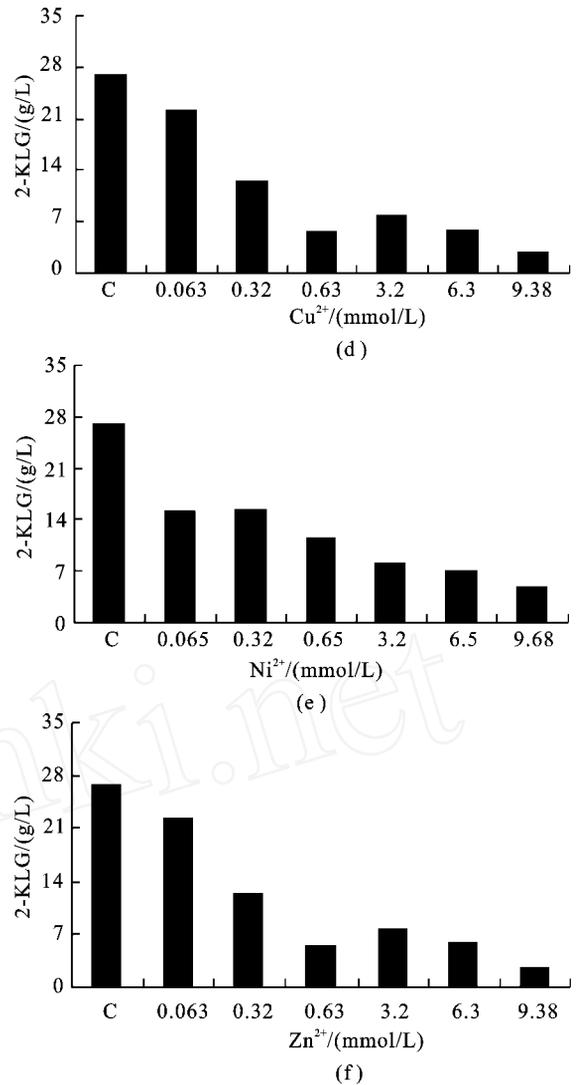
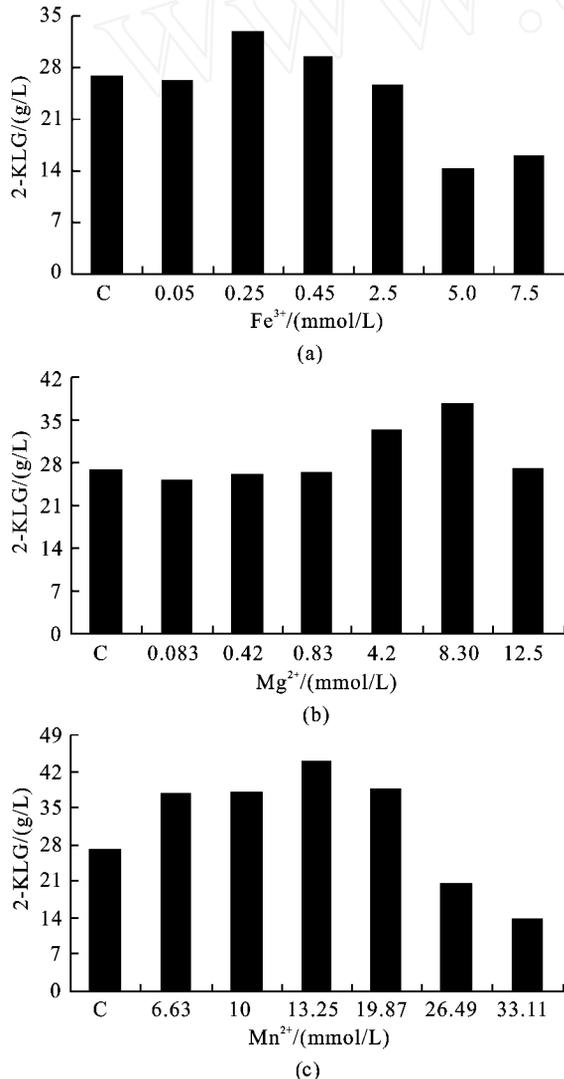
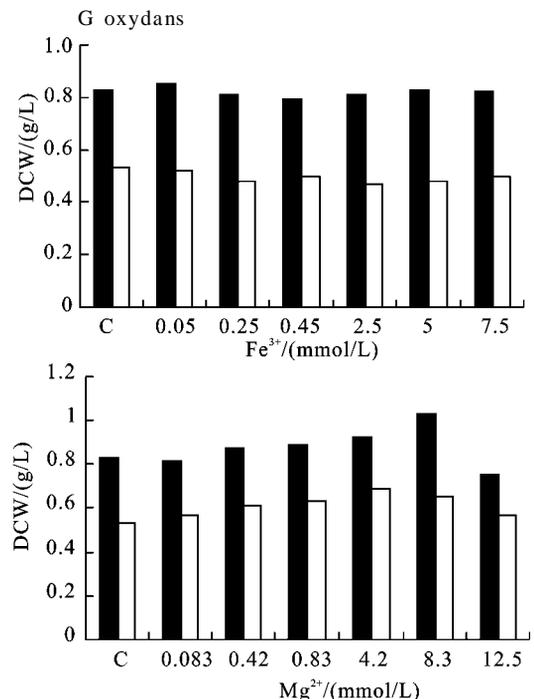


图 2 金属离子对 *G. oxydans* 发酵生产 2- KL G 的影响  
Fig. 2 Effect of metal ions on 2- KL G production by *G. oxydans*



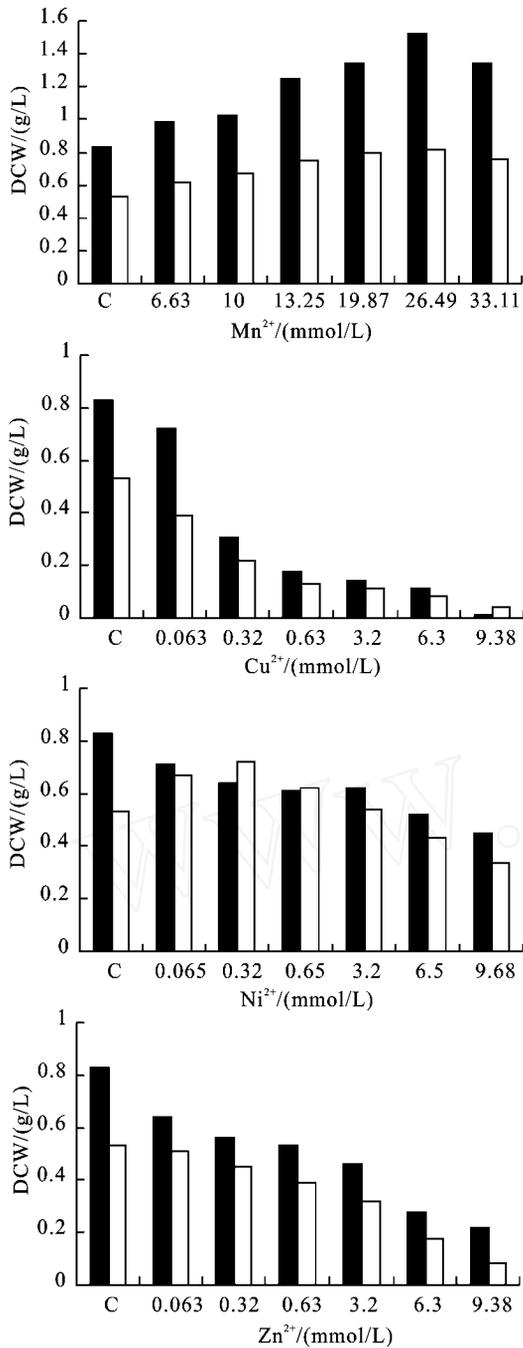


图 2 金属离子对 *G. oxydans* 和 *B. megaterium* 生长的影响

Fig. 2 Effect of metal ions on cell growth

对细胞生长和 2-KL G 产量进一步分析发现：(1) 与对照组比较,  $Mn^{2+}$  或  $Mg^{2+}$  的添加降低了单位细胞生产 2-KL G 的能力, 且单位细胞生产 2-KL G 的能力随着培养基中  $Mn^{2+}$  或  $Mg^{2+}$  浓度的增加而逐渐下降; (2) 而  $Fe^{3+}$  的添加 (0 ~ 0.25 mmol/L) 则促进了单位细胞生产 2-KL G 能力的提升, 当培养基中  $Fe^{3+}$  浓度为 0.25 mmol/L 时, 单位细胞产酸量达到最大值 (40.6 g/g), 与对照比较, 提高了 35.3%。上述结果表明,  $Mn^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  虽可促进细胞生长、阻止 *B. megaterium* 菌体自溶, 但弱化了

*G. oxydans* 代谢功能; 而一定浓度的  $Fe^{3+}$  则强化了 *G. oxydans* 发酵生产 2-KL G 的代谢能力<sup>[2]</sup>。

### 2.2 金属元素影响 2-KL G 合成的多元二次模型方程

前期研究表明,  $Mn^{2+}$  或  $Mg^{2+}$  能促进细胞生长, 但不促进产酸能力的提升; 而添加  $Fe^{3+}$  则能促进 2-KL G 的合成。结合 *G. oxydans* 中 2-KL G 的代谢途径 (图 1), 优化培养基中  $Mn^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$  浓度 (表 1), 以进一步提高 2-KL G 产量。上述不同金属离子浓度组合对 2-KL G 浓度的影响如表 2 所示, 当培养基中  $Mn^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$  浓度分别为 6.63、4.1 和 0.25 mmol/L (表 2, 实验 5) 时 2-KL G 产量达到最大值 (63.9 g/L); 而  $Mn^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$  浓度为 13.25、12.5、0.05 mmol/L 时 (表 2, 实验 4) 2-KL G 产量为最小值 (30.0 g/L)。对模型方程进行 F 值检验 (表 3,  $p < 0.0001$ ,  $R^2 = 0.9924$ ), 表明总模型方程能解释 99.24% 的 2-KL G 浓度变化, 总变异中仅 0.76% 不能由该模型解释, 很好地反应了真实实验数据。

表 1 中心组合实验因素水平表

Tab. 1 Factors and levels of Box-Behnken

因素	水平		
	-1	0	1
$X_1$ : $Fe_2(SO_4)_3$ (mmol/L)	0.05	0.25	0.45
$X_2$ : $MgSO_4$ (mmol/L)	4.1	8.3	12.5
$X_3$ : $MnSO_4$ (mmol/L)	6.63	13.25	19.87

表 2 Box-Behnken 实验设计方案和结果

Tab. 2 Design and experimental results of Box-Behnken

序号	$X_1$ [ $Fe_2(SO_4)_3$ ]	$X_2$ [ $MgSO_4$ ]	$X_3$ [ $MnSO_4$ ]	Y [2-KL G]
1	-1	-1	0	52.07
2	-1	0	-1	49.13
3	-1	0	1	37.71
4	-1	1	0	30.04
5	0	-1	-1	63.97
6	0	-1	1	57.88
7	0	1	-1	47.33
8	0	1	1	35.44
9	1	-1	0	57.01
10	1	0	-1	48.25
11	1	0	1	45.52
12	1	1	0	31.14
13	0	0	0	58.25
14	0	0	0	58.28
15	0	0	0	58.25

表 3 模型回归方程方差分析

Tab. 3 Variance analysis (ANOVA) for regression equation of model

回归	DF	平方和	R <sup>2</sup>	F	Pr > F
线性	3	1095.759 775	0.666 3	145.65	<.000 1
二次方程	3	505.332 818	0.307 3	67.17	0.000 2
积	3	30.975 425	0.018 8	4.12	0.080 9
总和模型	9	1 632.068 018	0.992 4	72.31	<.000 1

对实验数据进行方程拟合并进行方差分析,结果较显著,因此可用回归方程代替实验值进行分析(表 4)。采用多项式回归对实验数据进行拟合,得二次多项式方程:

$$Y = 58.37 + 1.62 x_1 - 10.87 x_2 - 4.02 x_3 - 10.90 x_1^2 - 0.96 x_1 x_2 - 4.90 x_2^2 + 2.17 x_1 x_3 - 1.45 x_2 x_3 - 2.31 x_3^2 \quad (2)$$

2.3 2-KLG 合成模型方程分析

保持培养基中  $Mn^{2+}$  ( $x_3$ ) 浓度为恒值,  $Fe^{3+}$  ( $x_1$ ) 和  $Mg^{2+}$  ( $x_2$ ) 对 2-KLG 产量的影响如图 4 所

示;相应地,分别维持  $Fe^{3+}$  ( $x_1$ )、 $Mg^{2+}$  ( $x_2$ ) 恒定时,其他两种金属元素浓度变化对 2-KLG 产量的影响如图 5 和图 6 所示。在等高线图中,极值条件需出现在圆心处。分析图 3-图 5 发现,  $Fe^{3+}$  与  $Mn^{2+}$  的交互影响最为显著,表现为等高曲线陡峭,  $Fe^{3+}$  与  $Mg^{2+}$  次之,而  $Mg^{2+}$  与  $Mn^{2+}$  的交互影响最弱,表现为等高曲线较为平滑。这一结果说明  $Fe^{3+}$  对 2-KLG 产量影响最大,而  $Mg^{2+}$  与  $Mn^{2+}$  则相对较小。

2.4 促进 2-KLG 合成的最佳金属元素组合

由于模型方程(2)中  $x_1$ 、 $x_2$ 、 $x_3$  的二次项系数为负,抛物线开口向下,因此方程有最大值(65.10 g/L)。采用 SAS 软件对方程进行岭脊分析,得到上述 3 个显著因素的最优组合:  $Fe^{3+}$  0.21 mmol/L、 $Mn^{2+}$  9.98 mmol/L 和  $Mg^{2+}$  4.23 mmol/L。以上述最优的金属元素组合进行实验,2-KLG 产量分别达到 65.0 g/L、65.2 g/L 和 65.1g/L,3 次重复实验的平均值为 65.1 g/L,接近预测值。表明模型方程真实可行,很好地预测了实验结果。

表 4 模型回归系数显著性检验和结果

Tab. 4 Significance test and results for regression coefficients of model

参数	DF	评估	标准误差	t	Pr >  t	参数评估
截距	1	58.366 667	0.914 299	63.84	<.000 1	58.366 667
$x_1$	1	1.621 250	0.559 892	2.90	0.034 0	1.621 250
$x_2$	1	-10.872 500	0.559 892	-19.42	<.0001	-10.872 500
$x_3$	1	-4.016 250	0.559 892	-7.17	0.000 8	-4.016 250
$x_1 * x_1$	1	-10.902 083	0.824 138	-13.2	<.000 1	-10.902 083
$x_2 * x_1$	1	-0.960 000	0.791 806	-1.21	0.279 5	-0.960 000
$x_2 * x_2$	1	-4.899 583	0.824 138	-5.95	0.00	-4.899 583
$x_3 * x_1$	1	2.172 500	0.791 806	2.74	0.006	2.172 500
$x_3 * x_2$	1	-1.450 000	0.791 806	-1.83	0.126 6	-1.450 000
$x_3 * x_3$	1	-2.312 000	0.824 138	-2.81	0.037 7	-2.312 083

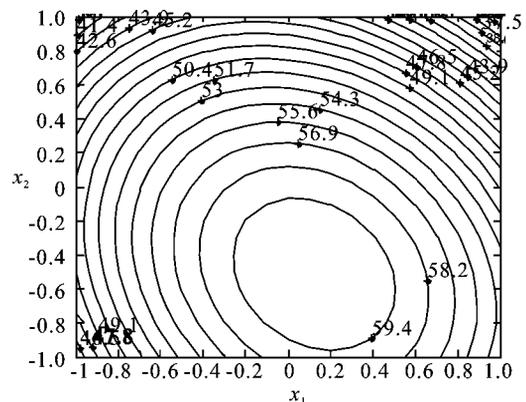
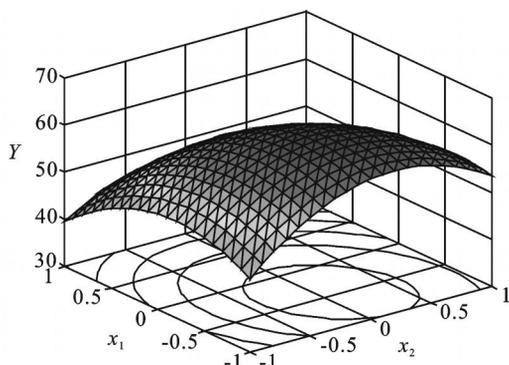


图 4  $Y = f(x_1, x_2)$  的响应面和等高线图

Fig. 4 Responsive surfaces and contour of  $Y = f(x_1, x_2)$

