

常压室温等离子体诱变选育耐高浓度L-山梨糖伴生菌及其发酵条件优化

秦 歌¹, 赖佳慧¹, 李 娜¹, 徐 慧², 杨伟超², 吕晓桂³, 满都拉^{1*}

¹内蒙古农业大学食品科学与工程学院, 内蒙古 呼和浩特

²中国科学院沈阳应用生态研究所, 辽宁 沈阳

³内蒙古农业大学理学院, 内蒙古 呼和浩特

收稿日期: 2026年7月24日; 录用日期: 2026年8月15日; 发布日期: 2026年8月25日

摘 要

在“二步发酵法”维生素C合成工艺中, 2-酮基-L-古龙酸(2-KLG, 维生素C合成的前体)是由普通生酮基古龙酸菌(*Ketogulonicigenium vulgare*)和伴生菌(*Bacillus*属的一些菌株)组成的混合发酵体系转化L-山梨糖完成。然而, 高浓度L-山梨糖对伴生菌具有强烈的抑制作用, 限制了高浓度底物的发酵效率。为获得耐受高浓度L-山梨糖的伴生菌, 本研究采用常压室温等离子体(Atmospheric and Room Temperature Plasma, ARTP)技术诱变伴生菌(*B. endophyticus*, B0), 筛选耐受突变株, 并对其发酵培养基进行了优化。结果表明, 在电压为12,000 V, 诱变时间为110 s时, B0的致死率达94.61%。在该条件下, 诱变筛选获得一株高L-山梨糖耐受突变株C31。其在8% L-山梨糖发酵培养基中能够提前2 h完成发酵, 且2-KLG产量达55.38 mg/ml, 显著高于出发菌株B0 ($P < 0.05$)。生理生化特性分析显示, C31与B0无差异。经优化, 由C31组成的混合发酵体系在10.3% L-山梨糖、0.91%尿素浓度、1.62%玉米浆、0.5%CaCO₃、0.010%MgSO₄、pH 6.7-7.0的发酵培养基中, 2-KLG平均产量为60.58 ± 1.36 mg/mL, 较出发菌株提高30%。

关键词

维生素C, 伴生菌, 2-酮基-L-古龙酸, 等离子体, 混菌发酵体系

Atmospheric and Room Temperature Plasma Mutagenesis of L-Sorbose-Tolerant Helper-Strain and Optimization of Fermentation Conditions

Ge Qin¹, Jiahui Lai¹, Na Li¹, Hui Xu², Weichao Yang², Xiaogui Lyu³, Mandlaa^{1*}

*通讯作者。

文章引用: 秦歌, 赖佳慧, 李娜, 徐慧, 杨伟超, 吕晓桂, 满都拉. 常压室温等离子体诱变选育耐高浓度 L-山梨糖伴生菌及其发酵条件优化[J]. 分析化学进展, 2026, 16(3): 228-241. DOI: 10.12677/aac.2026.163025

¹College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot Inner Mongolia

²Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang Liaoning

³College of Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot Inner Mongolia

Received: July 24, 2026; accepted: August 15, 2026; published: August 25, 2026

Abstract

In the two-step fermentation process for vitamin C synthesis, 2-keto-L-gulonic acid (2-KLG), the key precursor of vitamin C, is bio-transformed from L-sorbose by a mixed fermentation system consisting of *Ketogulonicigenium vulgare* and helper-strain (*Bacillus*). However, high concentrations of L-sorbose exert a strong inhibitory effect on helper-strain, which limits the fermentation efficiency with high-concentration substrates. To obtain helper-strain with tolerance to high concentrations of L-sorbose, Atmospheric and Room Temperature Plasma (ARTP) technology was employed to mutagenize the helper-strain, *Bacillus endophyticus* (strain B0), in this study, followed by screening for tolerant mutants and optimization of its fermentation medium. The results showed that the lethality rate of B0 reached 94.61% under the mutagenesis conditions of 12000 V voltage and 110 s treatment. A L-sorbose-tolerant mutant C31 was isolated under the above conditions. The co-culture system of C31 could complete fermentation in 48h in the fermentation medium containing 8% L-sorbose, with a 2-KLG yield of 55.38 mg/mL, which was significantly higher than that of the original strain B0 ($P < 0.05$). Physiological and biochemical characteristic analysis indicated that there were no differences between C31 and B0. After medium optimization, the co-culture system of C31 achieved an average 2-KLG yield of 60.58 ± 1.36 mg/mL in the fermentation medium containing 10.3% L-sorbose, 0.91% urea, 1.62% corn steep liquor, 0.5% CaCO_3 , 0.010% MgSO_4 and pH of 6.7-7.0, increased 30% compared with B0.

Keywords

Vitamin C, Helper-Strain, 2-Keto-L-Gulonic Acid, Plasma, Co-Culture System

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

维生素 C (Vitamin C), 化学名称为 L-抗坏血酸, 是维持机体正常代谢功能所必需的重要维生素, 在医药、食品及饲料等领域应用广泛[1][2]。目前, 我国维生素 C 的工业生产主要采用自主开发的“二步发酵法”。该工艺中第二步发酵以 L-山梨糖为底物, 通过微生物转化生成 2-酮基-L-古龙酸(2-keto-L-gulonic acid, 2-KLG), 再经两步化学反应合成维生素 C [3][4]。在维生素 C 的第二步发酵过程中, L-山梨糖转化 2-KLG 由产酸菌(*Ketogulonicigenium vulgare*, 亦称小菌)和伴生菌(通常为 *Bacillus* 属, 亦称大菌)构成的混菌发酵体系完成[5]。研究表明, 产酸菌单独培养时生长能力弱、产酸效率低, 无法实现 2-KLG 的高效率合成[6]。伴生菌虽不能直接转化 L-山梨糖, 但能通过代谢互作、营养供给及微环境调节等伴生效应, 显著促进产酸菌的生长与 2-KLG 的转化效率[7][8], 伴生菌的伴生作用在两菌混合发酵体系中起着至关重要的作用。因此, 选育高性能伴生菌株成为提升 2-KLG 合成效率的关键途径之一。

高浓度底物发酵是增加终产物浓度一条有效途径。如乳酸发酵中, *Enterococcus hirae* BoM 1-2 在底

物浓度提升后,其乳酸终浓度、体积产率显著提升[9]。在维生素 C 发酵中,适当提高 L-山梨糖浓度可显著提升 2-KLG 产量。这种高浓度底物条件下的产量提升,源于耐高浓度底物的伴生菌能维持与普通酮古龙酸菌的比例平衡,持续为后者提供营养物质与抗活性氧因子,进而促进其生长及 2-KLG 的转化[10]。然而,高浓度底物引发的渗透压胁迫会显著抑制菌体生长[11][12],这是制约高浓度底物发酵效率提升的关键。因此,筛选获得高底物耐受性菌株是实现高浓度发酵的前提。

常压室温等离子体(Atmospheric and Room Temperature Plasma, ARTP)诱变技术作为一种新兴的物理诱变方法,具有突变率高、操作安全、突变体遗传稳定的特点,近年来在工业微生物诱变育种中展现出显著优势[13]。等离子体产生的活性粒子可引起 DNA 损伤,进而驱动产生有益的遗传变异[14]。研究表明,经 ARTP 诱变技术获得 1 株可耐受 11%乙醇的热带醋杆菌(*Acetobacter tropicalis*)突变株 J2276,其应用于初始乙醇体积分数为 7.5%的啤酒中进行麦芽醋发酵,发酵产物浓度较出发菌株提高了 65.0%,且发酵周期缩短 1 d [15]。Shen 等在大肠杆菌中采用 ARTP 诱变技术获得的突变体在 4-羟基苯乙酸的生产和耐受性方面均具有良好表现,并且在连续培养 25 代后仍具有遗传稳定性[16]。

基于以上,本研究采用 ARTP 诱变技术,对维生素 C 生产菌系中的伴生菌进行诱变选育,旨在获得耐受高浓度 L-山梨糖的伴生菌突变株,并进一步利用响应面法优化其与产酸菌的共培养发酵培养基,为提升维生素 C 的生产效率和工艺水平奠定基础。

2. 材料与方法

2.1. 菌株

产酸菌(*Ketogulonicigenium vulgare* L4)与伴生菌(*Bacillus endophyticus* B0)均保存于中国科学院沈阳应用生态研究所环境微生物课题组。

2.2. 主要培养基与试剂

种子培养基(%): 葡萄糖 0.2, L-山梨糖 2.0, 尿素 0.1, 玉米浆 0.5, CaCO_3 0.2, pH 6.7~7.0。培养基于 121℃ 灭菌 20 min 后备用。

固体分离培养基(%): 酵母膏 0.3, 牛肉膏 0.3, 玉米浆 0.3, 蛋白胨 1.0, KH_2PO_4 0.1, MgSO_4 0.02, 尿素 0.1, CaCO_3 0.1, L-山梨糖 2.0, 琼脂 2.3, 10 ppm FeSO_4 0.1 mL/L, pH 6.7~7.0。培养基于 121℃ 灭菌 20 min 后备用。

发酵培养基(%): L-山梨糖 8.0, 玉米浆 1.5, CaCO_3 0.5, KH_2PO_4 0.1, MgSO_4 0.01, 尿素 1.2, 10 ppm FeSO_4 0.1 mL/L, pH 6.7~7.0(山梨糖及尿素与其他成分分别灭菌,其它培养基成分溶解并调节 pH 后加入 CaCO_3)。培养基于 121℃ 灭菌 20 min 后备用。

0.1%淀粉: 1 g 淀粉加水煮沸搅拌至溶解,定容 100 mL。

0.05 mol/L 碘液: 在含有 12.7 g 分析纯的 I₂ 烧杯中添加不含碘酸盐的 40 g KI,定容至 1000 mL。

7 mol/L H_2SO_4 : 500 mL 容量瓶中加入 250 mL 蒸馏水,然后缓慢加入 350 g H_2SO_4 (98%,比重 1.84),定容至 1000 mL。

2.3. 实验方法

2.3.1. 等离子体诱变条件

采用 ARTP 对伴生菌 B0 进行诱变处理。将处于对数生长期的 B0 用生理盐水重悬并调整菌浓度 $\text{OD}_{650\text{nm}}$ 为 0.3~0.6。将盛有菌悬液的容器放入诱变仪的镀膜石英板上,设置不同的处理时间(90 s、110 s、130 s、150 s 和 170 s)和电压(10,000 V、11,000 V、12,000 V、13,000 V 和 14,000 V),分别对其进行诱变

处理, 通过计算致死率确定最佳的诱变条件。

2.3.2. 致死率的计算

利用稀释平板法分别统计诱变前后菌悬液中的活菌数, 按照下述公式计算致死率。

$$\text{致死率}\% = \frac{\text{未诱变处理的菌落数} - \text{诱变处理后的菌落数}}{\text{未诱变处理的菌落数}} \times 100\%$$

2.3.3. 耐 L-山梨糖伴生菌的筛选

将在最佳致死率下诱变处理的菌液进行稀释, 涂布于固体培养基上, 在 29℃ 恒温培养箱中培养 48 h。待菌落形成后, 挑取单菌落分别接入含 8% 和 15% L-山梨糖的发酵培养基中培养(29℃、180 rpm/min 振荡培养 24 h), 通过测定 OD_{650nm} 值, 筛选耐高浓度 L-山梨糖的突变株。

2.3.4. 2-KLG 含量的测定

采用碘量法定量测定发酵液中 2-KLG 的浓度[17]。

2.3.5. 伴生菌生理生化特征分析

利用试剂盒对所筛菌株进行葡萄糖产酸产气试验、β-半乳糖试验、枸橼酸盐试验、明胶液化试验、淀粉水解试验、硫化氢试验、蔗糖试验、麦芽糖试验、硝酸盐试验和乳糖试验。以出发菌为参照, 比较诱变前后菌株的生理生化差异[18]。

2.3.6. 伴生菌生长特性研究

将菌株在种子培养基中活化后, 按照 15% 的接种比例接种于发酵培养基中, 29℃、180 rpm/min 振荡培养 24 h。每隔 2 h 取样测培养液中的菌浓度(OD_{650nm}), 绘制菌株生长曲线。

2.3.7. 种子液的制备

伴生菌: 菌落形态大小适中, 边缘整齐的菌落, 挑一环菌落, 放置于 2 ml 无菌水中, 震荡均匀, 制成伴生菌悬液。产酸菌: 挑单菌落产酸菌若干, 放置于 3 ml 无菌水中, 震荡均匀, 产酸菌的浓度以菌悬液为乳白色为准。产酸菌和伴生菌混菌悬液: 挑 1-2 环伴生菌悬液于产酸菌悬液中摇匀。

2.3.8. 伴生菌促进 2-KLG 转化的评价

分别制备诱变前后伴生菌种与产酸菌的混合种液, 按 15% 的接种量分别接种于含 8% 和 15% L-山梨糖的发酵培养基中, 29℃、180 rpm/min 发酵至稳定, 每隔 2 h 取样测定 2-KLG 含量, 评价突变伴生菌促进 2-KLG 转化的能力。

2.3.9. 不同浓度 L-山梨糖对突变伴生菌促进 2-KLG 转化的影响

将含有突变伴生菌和产酸菌的种液, 以 15% 接种量分别接种于含不同浓度 L-山梨糖(8%、10%、12%、14% 和 16%) 的发酵培养基中, 29℃、180 rpm/min 发酵 48 h 后测定 2-KLG 含量, 研究不同 L-山梨糖浓度对 2-KLG 转化的影响。

2.3.10. 发酵培养基的优化

以 2-KLG 含量为响应, 以单因素实验分别考察培养基组分(L-山梨糖、尿素、玉米浆、CaCO₃ 和 MgSO₄) 对 2-KLG 转化的影响。采用 12 次 Plackett-Burman 试验分别对培养基组分开展研究, 以识别出对 2-KLG 产量有显著影响的关键因子。根据 PB 试验得出的因素效应值, 确定各显著因子的变化方向和步长, 进行最陡爬坡实验, 确定最大响应区域。利用 Box-Behnken 设计进一步优化显著影响的因素, 确定最佳发酵培养基组成[19]。

2.3.11. 数据处理

所有试验均设置 3 次重复, 使用 Office Excel 对数据进行记录和绘图, 利用 IBM SPSS Statistics 27 软件对数据进行统计分析, 通过单因素方差分析对各处理间数据进行显著性检验。若 $P < 0.05$, 即认为差异显著, 利用 Design-Expert 7 进行响应面设计与分析。

3. 结果与分析

3.1. 不同诱变电压和时间对致死率的影响

为了确定常温等离子体诱变的最佳参数, 考察了不同电压与诱变时间对出发菌株 B0 致死率的影响。如图 1(a)所示, 相同诱变时间(110 s)条件下, 当诱变电压超过 11,000 V 时, 各处理的菌株致死率均达 90% 以上, 且均显著高于 10,000 V 的处理($P < 0.05$)。其中, 12,000 V 处理的致死率为 $94.61\% \pm 0.44\%$, 13,000 V 与 14,000 V 处理的致死率虽略有升高(分别为 $98.16\% \pm 0.96\%$ 与 $98.63\% \pm 0.72\%$), 但与 12,000 V 处理间无显著性差异($P > 0.05$)。在诱变时间上(见图 1(b)), B0 致死率随诱变时间延长而递增, 在处理 90 s 时, 致死率为 $84.37\% \pm 0.45\%$ 。当诱变时间大于 110 s 时, 致死率均大于 90%, 分别为 $94.61\% \pm 0.44\%$ (110 s), $96.41\% \pm 0.18\%$ (130 s), $97.98\% \pm 0.29\%$ (150 s) 和 $98.98\% \pm 0.50\%$ (170 s)。有研究表明, 诱变的致死率在 90%~95% 时, 诱变效果最佳[20] [21]。因此, 本研究选择 12,000 V 电压和 110 s 诱变作为最佳诱变条件。

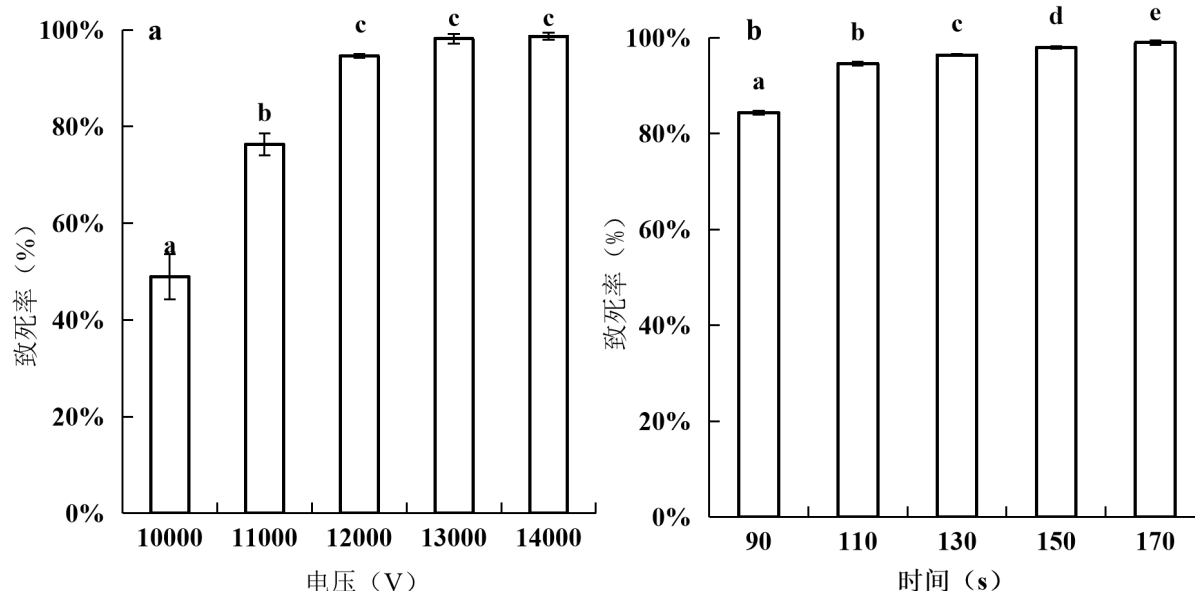
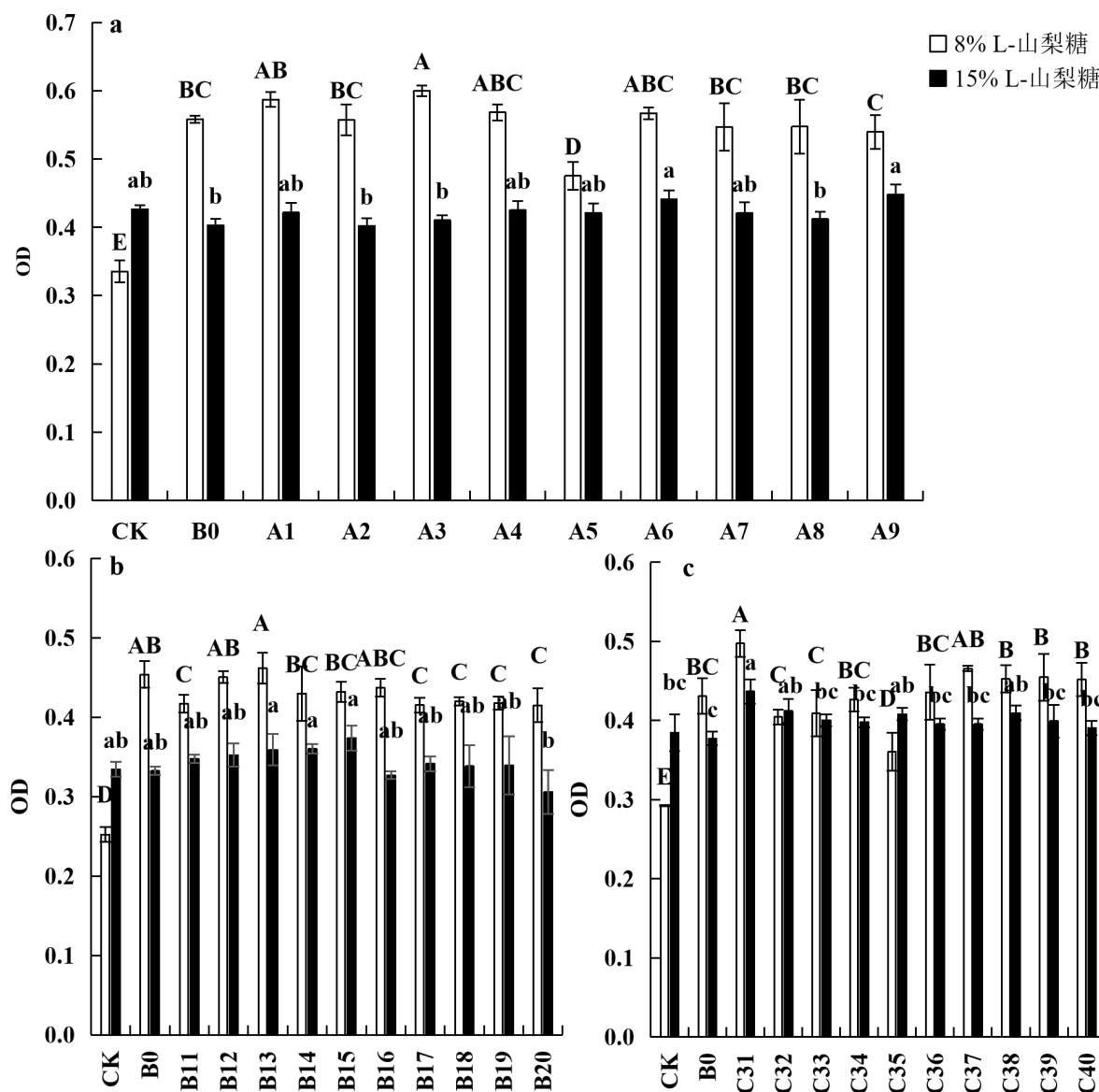


Figure 1. The effects of different mutagenesis voltages and durations on the lethality rate of B0

图 1. 不同诱变电压和时间对 B0 致死率的影响

3.2. 耐 L-山梨糖伴生菌突变株的初筛

在最佳诱变条件下对菌株 B0 进行诱变, 在 29℃ 恒温培养箱中培养 48h 后挑取单菌落, 分别接入含 8% 和 15% L-山梨糖的发酵培养基中进行初筛, 通过测定 OD_{650nm} 值共获得 29 株突变株。结果如图 2 所示。在 8% L-山梨糖发酵培养基中, A3 和 C31 变株的 OD 值显著高于出发菌 B0 ($P < 0.05$), 表明其在低浓度(8%) L-山梨糖中较出发菌 B0 具有更快的生长特性。而在高浓度(15%) L-山梨糖培养中, 仅 C31 的 OD 值显著高于出发菌株 B0 ($P < 0.05$), 表明 C31 不仅能够在低浓度 L-山梨糖中有较好的生长, 在高浓度 L-山梨糖中也较 B0 有更好的生长特性。因此, 选择 C31 和 A3 作为后续研究菌株。



(CK 表示空白培养基对照组, B0 表示诱变前菌株。不同大写字母表示 8%浓度的 L-山梨糖培养基中培养的诱变株的 OD 值存在显著差异, 小写字母表示在 15%浓度 L-山梨糖培养基中培养的诱变株的 OD 值存在显著差异, $P < 0.05$)

Figure 2. Primary screening of L-sorbose-tolerant strains

图 2. 耐高浓度 L-山梨糖诱变株的初筛

3.3. 耐 L-山梨糖伴生菌的复筛、耐受性与生长特性评价

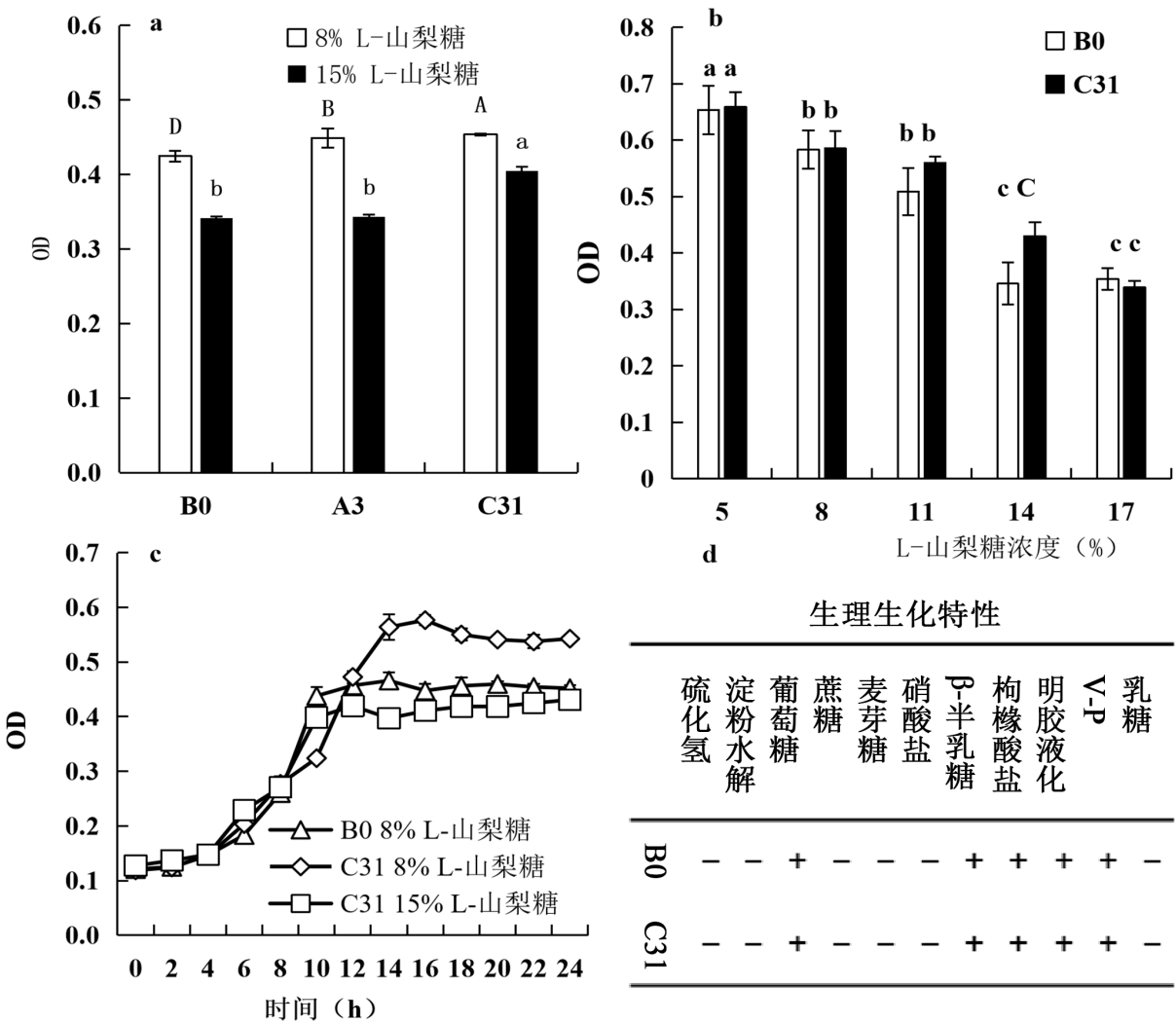
为了进一步确认突变菌株 C31 与 A3 对高浓度 L-山梨糖的耐受性, 以出发菌 B0 为对照, 对初筛获得的菌株进行进一步的生长特性评估。分别在含有 8%和 15% L-山梨糖的发酵培养基中培养上述菌株后发现, 在 8% L-山梨糖中, A3 和 C31 的 OD 值均显著高于 B0 ($P < 0.05$, 图 3(a)), 而在 15% L-山梨糖中只有 C31 的 OD 显著高于 B0 ($P < 0.05$, 图 3(a))。这一结果与初筛结果一致, 再次确认了 C31 菌株在 15% 高浓度 L-山梨糖环境下, 其生长性能显著优于出发菌株 B0, 说明 C31 具有耐受高浓度 L-山梨糖的能力。

设置不同 L-山梨糖浓度(5%、8%、11%、14%和 17%), 考察了 L-山梨糖对 C31 生长的影响, 结果如图 3(b)所示。B0 和 C31 的 OD 值均随 L-山梨糖浓度升高而降低。当山梨糖浓度为 14%时, C31 的 OD 值显著

高于 B0 ($P < 0.05$), 表明 C31 在较高浓度(14%) L-山梨糖条件下能够更好的生长, 其耐受性显著强于 B0。

通过绘制生长曲线的方式研究 C31 和 B0 的生长规律, 结果如图 3(c)所示。与 B0 在 8% L-山梨糖培养基中相比, C31 在 8% L-山梨糖培养基中具有更高的 OD 值, 且在 15% L-山梨糖培养中 C31 的 OD 值与在 8% L-山梨糖培养的 B0 的 OD 差异不显著($P > 0.05$), 进一步表明诱变后的 C31 具有耐受高浓度 L-山梨糖的能力。

另外, 与 B0 相比, 诱变后的 C31 生理生化特性无变化(如图 3(d)), 均能够使葡萄糖、 β -半乳糖、枸橼酸盐、明胶液化试验呈阳性, 且不能水解淀粉, 硫化氢、蔗糖、麦芽糖、硝酸盐、乳糖, 说明诱变过程未改变其基本代谢特性。



(a: L-山梨糖伴生菌的复筛; b: 不同浓度 L-山梨糖对 C31 生长的影响; c: C31 在同浓度 L-山梨糖中的生长规律; d: C31 的生理生化特征+为阳性, -为阴性)

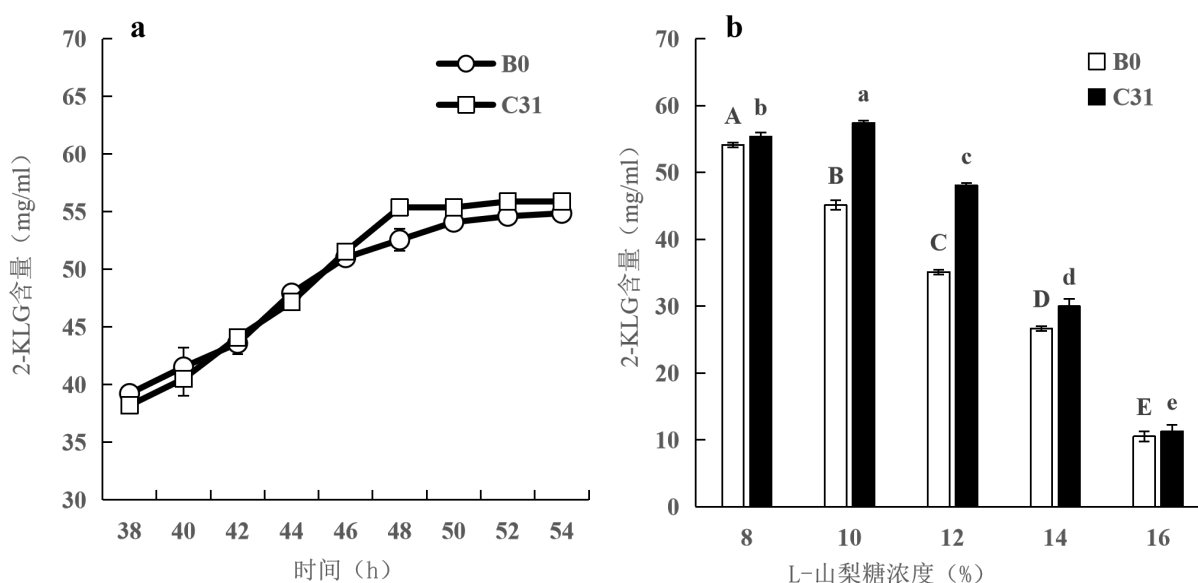
Figure 3. Re-screening, tolerance evaluation and growth characteristics of L-sorbose-tolerant associated bacteria
图 3. 耐高浓度 L-山梨糖伴生菌的复筛、耐受能力评价与生长特性

3.4. C31 与 L4 混合发酵转化 2-KLG 能力评价

将诱变前后的两株菌(B0 和 C31)分别与产酸菌(L4)进行混合发酵, 考察在 8 % L-山梨糖浓度下 2-KLG

含量的变化及在不同 L-山梨糖浓度下(8%、10%、12%、14%和 16%)的 2-KLG 终产量的变化,结果如图 4 所示。在 8% L-山梨糖发酵时(图 4(a)),随着发酵的进行,诱变前后菌株在前 46 h 发酵过程中的 2-KLG 转化量间无显著差异($P > 0.05$)。但在第 48 h 时,突变菌系(C31+L4)的 2-KLG 产量为 55.38 mg/ml,显著高于 B0 ($P < 0.05$),之后(50~54 h)突变菌系的 2-KLG 产量变化不显著($P > 0.05$),表明突变菌系在第 48 h 停止产 2-KLG,到达发酵终点。相比而言,原菌系(B0+L4)在第 50 h 才到达发酵终点,突变菌系较原菌系能缩短发酵周期 2 h。

在不同浓度 L-山梨糖发酵中,随着 L-山梨糖浓度的增加,原菌系 2-KLG 产量逐渐降低。突变菌系在含 10% L-山梨糖培养基中的 2-KLG 产量显著高于其他山梨糖浓度,且显著高于 B0 (图 4(b), $P < 0.05$)。另外,与原菌系相比,突变菌系在高浓度 L-山梨糖(10%、12%和 14%)中均具有更好地促进 2-KLG 转化能力。基于上述结果,后续研究将以 10% L-山梨糖作为 C31 与产酸菌混合发酵产 2-KLG 的最适浓度进行培养基的优化。



(a: 8% L-山梨糖发酵过程中 2-KLG 含量变化; b: 不同浓度 L-山梨糖对 2-KLG 产量的影响)

Figure 4. Evaluation of the 2-KLG production capacity of C31 in mixed-strain fermentation

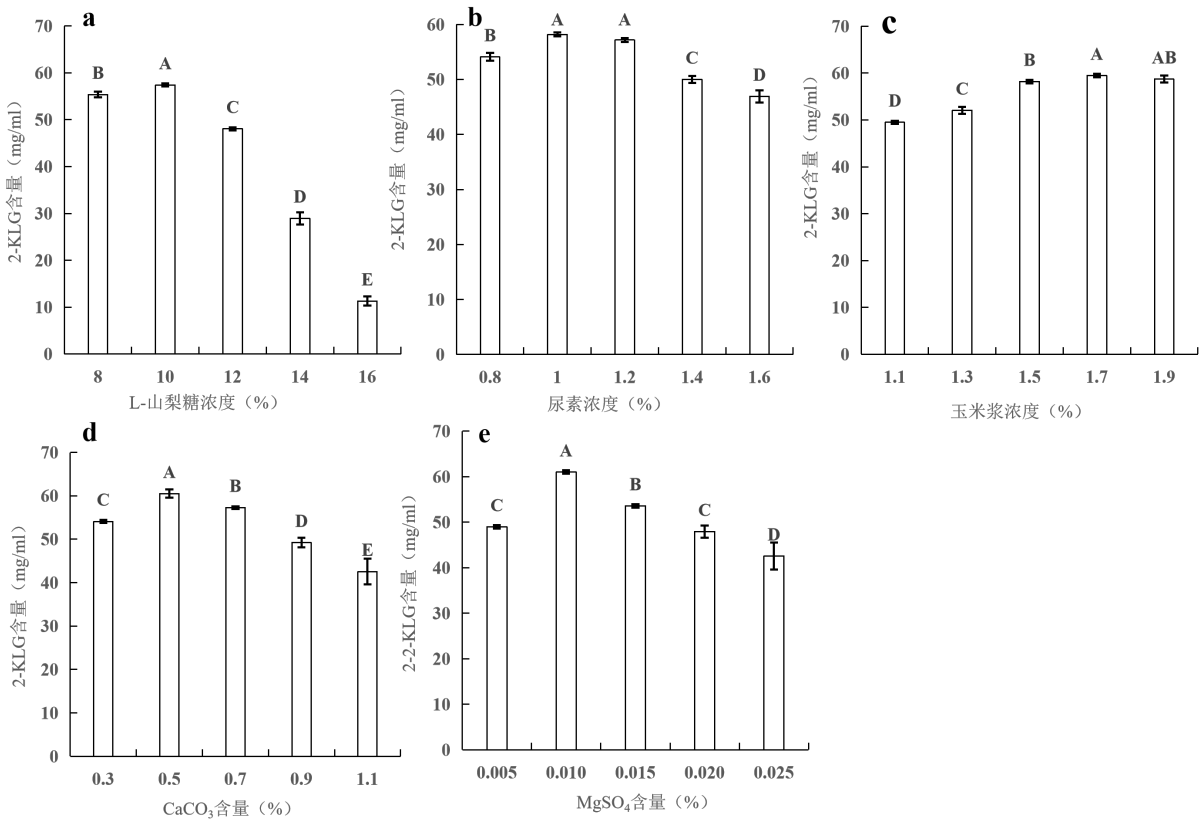
图 4. C31 混菌发酵转化 2-KLG 能力评价

3.5. C31 混合发酵培养基优化

3.5.1. 单因素试验

为了确定突变菌系的培养基最适组成,研究在单因素试验中,固定发酵培养基中其他组分浓度不变,分别调整了 L-山梨糖、尿素、玉米浆、 CaCO_3 和 MgSO_4 的浓度考察其对突变株 C31 促进产酸菌产 2-KLG 的影响。结果如图 5 所示。作为发酵的直接底物, L-山梨糖浓度对 2-KLG 产量有显著影响($P < 0.05$)。如图 5(a)所示,当山梨糖浓度达到 10%时, 2-KLG 最高(57.43 mg/mL)。浓度过低时底物供给不足,过高时(>10%)则可能因渗透压胁迫或底物抑制效应[22] [23],反而不利于菌体生长。微生物生长过程中,尿素不仅作为氮源,同时也作为一种生理碱调节微生物生长的 pH 环境等[24]。由图 5(b)可知,当尿素浓度为 1%时, 2-KLG 产量达到最高值($P < 0.05$)。因此,选择 1%为最优的尿素浓度。玉米浆提供了丰富的碳、氮、生长因子和微量元素,其含有的氨基酸与生物活性物质对菌体生长和代谢具有重要促进作用[25],当玉米浆浓度增加至 1.7%时, 2-KLG 产量达到最高(如图 5(c), $P < 0.05$),故确定其最适浓度为 1.7%。 CaCO_3 作

为 pH 缓冲剂在混合发酵中起到关键作用。由图 5(d)可知, 当 CaCO_3 浓度为 0.5% 时, 2-KLG 产量最高($P < 0.05$)。 CaCO_3 浓度过低时, 难以有效中和产生的酸, 进而影响整个发酵转化。因此, CaCO_3 的最佳浓度为 0.5%。 Mg 和 S 是微生物生长繁殖所必需的微量元素, 但高浓度的 MgSO_4 会激活 2-KLG 还原酶, 促使 2-KLG 向 L-艾杜糖酸等副产物转化[26] [27], 导致产酸率的下降。图 5(e)结果显示, 当 MgSO_4 浓度为 0.010% 时, 突变菌系的 2-KLG 产量最高($P < 0.05$), 故 MgSO_4 最佳浓度为 0.010%。



(a: L-山梨糖浓度对 2-KLG 产量的影响; b: 尿素浓度对 2-KLG 产量的影响; c: 玉米浆浓度对 2-KLG 产量的影响; d: CaCO_3 浓度对 2-KLG 产量的影响; e: MgSO_4 浓度对 2-KLG 产量的影响)

Figure 5. Effects of medium components on 2-KLG production by mixed fermentation of strain C31 and L4
图 5. 培养基成分对 C31 与产酸菌 L4 混合发酵产 2-KLG 的影响

3.5.2. Plackett-Burman 试验

为进一步筛选显著影响突变菌系转化 2-KLG 的因素, 根据单因素试验结果, 利用 Plackett-Burman 试验进行因子分析实验, 试验设计及结果如表 1 所示。

Table 1. Experimental design and results of Plackett-Burman
表 1. Plackett-Burman 试验设计与结果

试验编号	A: L-山梨糖(%)	B: 尿素(%)	C: 玉米浆(%)	D: CaCO_3 (%)	E: MgSO_4 (%)	2-KLG (mg/mL)
1	8	1	1.5	0.7	0.015	49.7390
2	10	1	1.7	0.5	0.015	58.9689
3	8	0.8	1.7	0.5	0.01	49.3544
4	10	0.8	1.7	0.5	0.01	59.7381

续表

5	8	1	1.7	0.7	0.01	52.9438
6	8	1	1.7	0.5	0.015	51.6619
7	8	0.8	1.5	0.5	0.015	46.4060
8	8	1	1.5	0.5	0.01	48.9698
9	10	0.8	1.7	0.7	0.01	57.1742
10	10	1	1.5	0.5	0.015	57.4306
11	8	1	1.7	0.5	0.01	54.3540
12	10	0.8	1.5	0.5	0.01	54.0976

基于表 1，模型具有良好的拟合度。从相关系数来看， R^2 为 0.9525，表示模型与实际数据之间存在着良好的相关性。 R^2 adj 为 0.9130，意味能对 91.30% 的试验数据做出合理的解释，体现了模型的有效性。

通过多元回归分析方法对数据分析，得到回归方程模型： $Y = 53.46 + 3.90A + 1.47B + 1.58C - 0.03D - 0.42E$ ，A (L-山梨糖)，B (尿素)和 C (玉米浆)对 KLG 转化有显著影响，且均为正向影响。

Table 2. Significance analysis of Plackett-Burman test

表 2. Plackett-Burman 试验显著性分析

	自由度	平方和	均方	F 值	P 值	显著性
模型	5	194.90	38.98	24.08	0.000 7	显著
A	1	157.15	157.15	97.08	<0.0001	显著
B	1	18.99	18.99	11.73	0.0141	显著
C	1	25.75	25.75	15.91	0.0072	显著
D	1	0.0085	0.0085	0.0052	0.9447	不显著
E	1	1.57	1.57	0.9717	0.3623	不显著
残差	6	9.71	1.62			
总和	11					
$R^2 = 0.9525$						
R^2 adj = 0.9130						
Pred R^2 = 0.8324						
Adeq Precisor = 15.4502						

3.5.3. 最陡爬坡试验

基于 Plackett-Burman 实验的结果，分别以 1% L-山梨糖、0.04% 尿素和 0.04% 玉米浆为步长进行最陡爬坡试验逼近最大响应区，为进一步进行响应面优化奠定基础。从实验结果可知(表 3)，处理 3 的 2-KLG 产量最高。因此，以处理 3 为响应面试验的中心点进行响应面优化。

3.5.4. 响应面优化

根据最陡爬坡试验结果，以处理 3 为中心点进行 Box-Behnken 设计，实验设计与结果如表 4 所示。

Table 3. Experimental design and results of Steepest Ascent method**表 3.** 最陡爬坡试验设计及其结果

处理	步长	A(%)	B(%)	C(%)	2-KLG 含量(mg/mL)
1	0	8	0.8	1.5	48.7135
2	0 + 1Δ	9	0.84	1.54	55.3794
3	0 + 2Δ	10	0.88	1.58	57.1682
4	0 + 3Δ	11	0.92	1.62	56.4051

注: Δ 表示一个步长单位。

Table 4. Experimental design and results of Box-Behnken test**表 4.** Box-Behnken 试验设计及其结果

试验号	A(%)	B(%)	C(%)	2-KLG 含量(mg/mL)
1	10	0.84	1.54	52.3029
2	9	0.84	1.58	43.3293
3	10	0.92	1.62	60.5073
4	9	0.88	1.54	43.3293
5	11	0.88	1.62	54.8667
6	9	0.92	1.58	48.9699
7	11	0.92	1.58	53.9694
8	10	0.88	1.58	54.6104
9	9	0.88	1.62	47.1751
10	10	0.88	1.58	54.8667
11	11	0.84	1.58	50.2518
12	10	0.92	1.54	49.9954
13	10	0.88	1.58	58.1998
14	10	0.84	1.62	52.8157
15	11	0.88	1.54	48.4571

方程为 $Y = 57.43 + 3.09A + 1.84B + 2.66C - 0.48AB + 0.64AC + 0.25BC - 6.11A^2 - 0.66B^2 - 1.33C^2$ 。由表 5 可知, 该模型显著($P < 0.05$), $R^2 = 0.9700$, $R^2_{adj} = 0.9159$, 表明该模型可以解释 91.59% 的响应值的变化。进一步可知, 因素一次项 A、B 和 C 对产 2-KLG 影响显著($P < 0.05$)。

Table 5. ANOVA of Quadratic Model for Box-Behnken design**表 5.** Box-Behnken 试验设计二次模型方差分析

来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值	显著性
模型	9	328.29	36.48	17.94	0.0027	显著
A	1	76.52	76.52	37.63	0.0017	显著
B	1	27.17	27.17	13.36	0.0147	显著
C	1	56.61	56.61	27.83	0.0033	显著
AB	1	0.9244	0.9244	0.4545	0.5301	

续表

AC	1	1.64	1.64	0.8081	0.4099	
BC	1	25.00	25.00	12.29	0.0172	
A ²	1	137.63	137.63	67.67	0.0004	
B ²	1	1.59	1.59	0.7837	0.4166	
C ²	1	6.53	6.53	3.31	0.1331	
残差	5	10.17	2.03			
失拟	3	2.15	0.7162	0.1786	0.9029	不显著
CV(%)= 2.76						
R ² = 0.9700						
R ² adj = 0.9159						
Pred R ² = 0.8451						
Adeq Precision = 15.0832						

利用 Design-Expert 13 软件对突变菌系培养基配方与最高 2-KLG 产量进行预测后得到，在 L-山梨糖浓度为 10.28%、尿素浓度为 0.91%、玉米浆浓度为 1.62%时，突变菌系发酵得到的 2-KLG 的产量为 60.62 mg/mL。经过三次重复实验验证，优化后突变菌系的 2-KLG 产量为 60.58±1.36 mg/mL，同预测值吻合。与出发菌株 B0 相比，C31 展现出显著优势，即在 8% L-山梨糖培养基中发酵周期缩短 2 h，而在较高浓度 L-山梨糖培养基(10%)中可提高 2-KLG 产量 30%。

4. 讨论

本研究在 94.61%致死率的 ARTP 诱变条件下成功筛选获得高浓度 L-山梨糖耐受突变株 C31，该菌株生理生化表型与原始出发菌株 B0 完全一致，表明诱变仅定向调控菌株渗透压耐受相关遗传通路，未改变其基础代谢特征。在 8% L-山梨糖发酵体系内，C31 与产酸菌构成的共培养体系发酵周期缩短 2 h，其内在原因是突变株可在高渗透压环境下维持稳定增殖，构建合适的菌群比例，持续为产酸菌供给营养及抗氧化活性物质。而原始伴生菌受高底物胁迫生长受限，菌群协同作用滞后。Plackett-Burman 筛选结果显示，L-山梨糖、尿素、玉米浆浓度为影响 2-KLG 合成的显著正向因子，三者存在营养协同效应：L-山梨糖作为转化底物提供碳源；尿素既能补充菌体所需氮源，又对体系 pH 起缓冲功能。玉米浆富含氨基酸与微量元素，可强化伴生菌抗逆能力。CaCO₃、MgSO₄的有效作用区间较窄，小幅度浓度波动对 2-KLG 合成量无显著影响，故在显著性分析中未体现作用。经响应面法优化培养基组分后，混菌体系 2-KLG 产量较原始菌系提升 30%，该结果得益于菌株耐渗特性改良与发酵培养基营养配比的优化。

5. 结论

本研究采用 ARTP 技术诱变选育耐高浓度 L-山梨糖伴生菌，并对诱变菌株的特性及混菌发酵条件进行了系统优化。在诱变电压为 12,000 V，诱变时间为 110 s 时，出发菌的致死率为 94.61%。基于此条件进行诱变，筛选得到了一株能够耐受高浓度 L-山梨糖的突变株 C31。与出发株相比，C31 对 L-山梨糖的耐受性显著提升，能够在 15% L-山梨糖发酵培养基中正常生长，同时保持了原有的生理生化特性。进一步通过培养基优化，得到了 C31 作为伴生菌的最佳发酵培养基配方，在该配方下，突变菌系发酵转化 2-KLG 的平均含量为 60.58±1.36 mg/mL，较出发菌提高 30%。在维生素 C 二步发酵工业中，菌种选育与发酵工艺优化是提升 2-KLG 转化率的关键。孟静等[28]通过太空诱变及发酵条件优化，新组合菌系在 8%

L-山梨糖培养基中, 发酵转化率较生产菌提高 3%~6%。虞龙等[29]采用低能离子注入诱变 Vc 伴生菌, 获得的高产菌株 Gab 在投糖浓度 10%水平始终保持较高增长率转化 2-KLG, 平均罐批糖酸转化率 92%。卢育新等[30]利用微波-吡啶橙复合诱变苏云金芽孢杆菌, 筛选的突变株在发酵液中产 2-KLG 质量浓度达 90.2 mg/mL, 糖酸转化率比出发菌株提高了 7.77%。这些研究表明, 新型诱变技术能够有效突破传统诱变限制, 产生多样性突变株, 结合发酵条件优化可显著提升 Vc 二步发酵效率。本研究显示出 ARTP 物理诱变技术在提高伴生菌耐高渗方面的适用性以及发酵培养条件优化的必要性, 实现了更高的产物浓度和发酵效率, 为菌株选育和高浓度底物发酵提供了参考。

基金项目

中央引导地方科技发展资金项目(2022ZY0104)。

参考文献

- [1] 慕金凤. 2-酮基-L-古龙酸合成维生素 C 工艺研究进展[J]. 石油化工应用, 2024, 43(12): 11-13.
- [2] Spinola, V., Llorent-Martínez, E.J. and Castilho, P.C. (2014) Determination of Vitamin C in Foods: Current State of Method Validation. *Journal of Chromatography A*, **1369**, 2-17. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.09.087>
- [3] 李进. 维生素 C 的合成方法及生物学功能研究进展[J]. 食品工程, 2025(3): 12-14+48.
- [4] 尹光琳, 陶增鑫, 于龙华, 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.
- [5] 郭瑞. Vc 混菌发酵体系的氧化胁迫与群体感应作用[D]: [硕士学位论文]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2024.
- [6] 李麟, 李秉超, 吕淑霞, 等. 分阶段控制通风量提高 2-酮基-L-古龙酸生产[J]. 中国酿造, 2012, 31(4): 144-147.
- [7] 王淑娟, 王军, 虞龙, 等. *Bacillus Megaterium* 在 VC 二步发酵中伴生活性初步研究[J]. 中国科学院研究生院学报, 2004, 21(1): 84-88.
- [8] Mandlaa, M., Yang, W.C., Han, L.T., et al. (2013) Two-Helper-Strain Co-Culture System: A Novel Method for Enhancement of 2-Keto-L-Gulonic Acid Production. *Biotechnology Letters*, **35**, 1853-1857. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1292-5>
- [9] Abdel-Rahman, M.A., Hassan, S.E., Azab, M.S., Mahin, A. and Gaber, M.A. (2019) High Improvement in Lactic Acid Productivity by New Alkaliphilic Bacterium Using Repeated Batch Fermentation Integrated with Increased Substrate Concentration. *BioMed Research International*, **2019**, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2019/7212870>
- [10] Mandlaa, Yang, W.C., Liu, C.B. and Xu, H. (2015) L-Sorbose Is Not Only a Substrate for 2-Keto-L-Gulonic Acid Production in the Artificial Microbial Ecosystem of Two Strains Mixed Fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **42**, 897-904. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1616-7>
- [11] Estruch, F. (2000) Stress-Controlled Transcription Factors, Stress-Induced Genes and Stress Tolerance in Budding Yeast. *FEMS Microbiology Reviews*, **24**, 469-486. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00551.x>
- [12] Dragosits, M., Stadlmann, J., Graf, A., Gasser, B., Maurer, M., Sauer, M., et al. (2010) The Response to Unfolded Protein Is Involved in Osmotolerance of *Pichia Pastoris*. *BMC Genomics*, **11**, Article No. 207. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-207>
- [13] Li, G., Li, H.P., Wang, L.Y., et al. (2008) Genetic Effects of Radio-Frequency, Atmospheric-Pressure Glow Discharges with Helium. *Applied Physics Letters*, **92**, Article 221504. <https://doi.org/10.1063/1.2938692>
- [14] 袁姚梦, 邢新会, 张翀. 微生物细胞工厂的设计构建: 从诱变育种到全基因组定制化创制[J]. 合成生物学, 2020, 1(6): 656-673.
- [15] 钱沁, 张明, 杨华, 等. 耐乙醇醋酸菌的选育及其在麦芽醋酿造中的应用[J]. 食品与生物技术学报, 2025, 44(4): 115-123.
- [16] Shen, Y.P., Pan, Y.Y., Niu, F.X., et al. (2021) Biosensor-Assisted Evolution for High-Level Production of 4-Hydroxyphenylacetic Acid in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, **70**, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2021.12.008>
- [17] Yang, W., Han, L., Mandlaa, M., Zhang, H., Zhang, Z. and Xu, H. (2017) A Plate Method for Rapid Screening of Ketogulonigenium Vulgare Mutants for Enhanced 2-Keto-L-Gulonic Acid Production. *Brazilian Journal of Microbiology*, **48**, 397-402. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.02.002>

- [18] 周龙霞, 郑学云, 薛峰, 等. 天山雪莲菌酸奶中菌株的分离及生理生化鉴定[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(18): 7963-7964.
- [19] 满都拉, 杨伟超, 徐慧, 等. 2-酮基-L-古龙酸发酵条件优化[J]. 食品与发酵科技, 2011, 47(3): 60-63+67.
- [20] Cao, S., Zhou, X., Jin, W., Wang, F., Tu, R., Han, S., *et al.* (2017) Improving of Lipid Productivity of the Oleaginous Microalgae *Chlorella pyrenoidosa* via Atmospheric and Room Temperature Plasma (ARTP). *Bioresource Technology*, **244**, 1400-1406. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.039>
- [21] Zhang, X., Zhang, X.F., Li, H.P., *et al.* (2014) Atmospheric and Room Temperature Plasma (ARTP) as a New Powerful Mutagenesis Tool. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **98**, 5387-5396. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5755-y>
- [22] 曾伟主, 单小玉, 房峻, 等. 微液滴适应性进化强化大肠杆菌耐受高浓度 L-山梨糖[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(1): 1-7.
- [23] 单小玉. 2-酮基-L-古龙酸高产菌株的定向选育[D]: [硕士学位论文]. 无锡: 江南大学, 2020.
- [24] 王静, 冯文亮, 王丽丽, 等. 一株芽孢杆菌在维生素 C 二步发酵中对小菌的促进作用[J]. 生物加工过程, 2009, 7(1): 24-28.
- [25] Zhang, J., Zhou, J., Liu, J., Chen, K., Liu, L. and Chen, J. (2011) Development of Chemically Defined Media Supporting High Cell Density Growth of *Ketogulonicigenium Vulgare* and *Bacillus Megaterium*. *Bioresource Technology*, **102**, 4807-4814. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.124>
- [26] 吕淑霞, 高明, 马镒, 等. 响应面法优化 VC 二步混合菌新菌系发酵培养基[J]. 食品科学, 2013, 34(3): 202-206.
- [27] 李野, 厉学, 张怡轩. 酮古龙酸菌与呼吸链偶联的 2-KGA 代谢途径研究进展[J]. 微生物学报, 2014, 54(10): 1101-1108.
- [28] 孟静. Vc 二步发酵新菌系的太空诱变选育及其发酵条件优化[D]: [硕士学位论文]. 沈阳: 东北大学, 2010.
- [29] 虞龙, 余增亮. 一种新型诱变技术在 Vc 前体(2-KLG)产生菌遗传改良中的作用[J]. 高技术通讯, 2002, 12(11): 41-46.
- [30] 卢育新, 刘春雷, 张全钢, 等. 微波-吡啶橙复合诱变选育 Vc 发酵伴生菌[J]. 科技信息(学术研究), 2007(18): 36-37.