响应面法优化胶红酵母伴生的维生素 C 混菌发酵培养基

廖 林， 吕淑霞*， 张云鹤， 姚 硕， 张 良， 马 镝， 林 英， 于晓丹

（沈阳农业大学 生物科学技术学院，辽宁 沈阳 110866）

摘要： 从沈阳东陵龙尾湖淤泥中，筛选分离到一株具有促进维生素 C（VC）混菌发酵中产酸菌 *K. vulgare* 产酸的新伴生菌 A8，对菌株 A8 核糖体 ITS rDNA 进行 PCR 扩增并测序，获得长度为 610 bp 的 ITS rDNA 序列。在 NCBI 数据库上进行同源性比对，构建 ITS rDNA 系统发育树，并进行系统发育分析，再结合形态学鉴定，确认菌株 A8 为胶红酵母菌（*Rhodotorula mucilaginosa*）。该菌与 *K. vulgare* 组成 VC 混菌发酵新菌系，产 2-酮基-L-古龙酸（2-KGA）量高达 52.56 g/L。在单因素试验基础上，采用响应面法对发酵培养基成分进行优化，得到最佳培养基条件为：L-山梨糖 80 g/L、尿素 14 g/L、玉米浆 15 g/L、$CaCO_3$ 1.58 g/L、$MgSO_4$ 0.3 g/L、KH_2PO_4 1.0 g/L。在优化条件下发酵，可使 2-KGA 产量达 70.08 g/L，与理论值 70.38 g/L 基本一致，转化率达 81.3%。优化后的培养基比原培养基平均提高 2-KGA 产量 17.52 g/L，表明新筛选的胶红酵母菌具有较强促产酸的伴生能力，并且该菌在通常情况下对动物和人体不致病，为工业生产提供重要的伴生菌资源。

关键词： 胶红酵母；维生素 C 混菌发酵；分离；鉴定；响应面法

中图分类号：Q 819　**文章编号：**1673-1689(2020)02-0054-12　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.02.008

Optimization of Medium by Response Surface Methodology for Vitamin C Mixed Culture Fermentation with A New Companion Strain *Rhodotorula mucilaginosa*

*LIAO Lin, LYU Shuxia**, *ZHANG Yunhe, YAO Shuo*, *ZHANG Liang*, *MA Di*, *LIN Ying*, *YU Xiaodan*

（College of Bioscience and Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Shenyang, 110866, China）

Abstract: A new company strain of A8, which can promote 2-keto-L-gulonic acid (2-KGA) produced by *K. vulgare* in vitamin C (VC) mixed culture fermentation, was separated from the source of Longwei Lake silt, Dongling Shenyang. The ITS rDNA was amplified by PCR and sequenced to obtain a 610 bp ITS rDNA. Analysis was performed by homology comparison with the NCBI database to construct the phylogenetic tree basing on ITS rDNA sequences. And the strain of A8 was

收稿日期： 2017-07-23

基金项目： 国家自然科学基金项目（31370077）；辽宁省自然科学基金项目（20170540800）。

* **通信作者：** 吕淑霞（1963—），女，博士，教授，博士研究生导师，主要从事微生物生化与分子生物学方面的研究。

E-mail: lushuxia@syau.edu.cn

determined as *Rhodotorula mucilaginosa* based on the molecular identification combining with morphological identification. The *R. mucilaginosa* and *K. vulgare* composed of a new mixed culture of VC fermentation system and the production yield of 2-KGA was 52.56 g/L.

Based on single factor tests, the components of fermentation medium were optimized by response surface methodology (RSM). The optimal culture conditions were as follows: 80 g/L L-sobose, 14 g/L urea, 15 g/L corn liquor, 1.58 g/L $CaCO_3$, 0.3 g/L $MgSO_4$ and 1 g/L KH_2PO_4. The yield of 2-keto-L-gulonic acid was up to 70.08 g/L under the optimal medium in VC fermentation, which is consistent with the theoretical value of 70.38 g/L and the conversion rate was 81.3%. The average yield of 2-KGA was increased to 17.52 g/L with the optimized medium more than with the original medium, suggesting that the *R. mucilaginosa* have the companying ability to *K. vulgare* for promoting 2-KGA production. In addition, *R. mucilaginosa* is not pathogenic to animals and human body in normal conditions, which can be used as a new company strain for VC industrial production.

Keywords: *Rhodotorula mucilaginosa*, vitamin C mixed culture fermentation, isolation, identification, response surface methodology

维生素 C(VC)是一种重要的人体必需维生素,在医药、食品、饲料、化妆品等领域广泛应用。混菌发酵转化 L-山梨糖为 2-酮基-L-古龙酸(2-KGA)是二步发酵法[1]生产 VC 工艺的核心过程。早期报道的 VC 混菌发酵体系是由氧化葡萄糖酸杆菌 (*G. oxydans*)和条纹假单胞杆菌(*P. striata*)组成[2]。其中,氧化葡萄糖酸杆菌为产酸菌, 条纹假单胞杆菌为伴生菌。Urbance 等[3]对产酸菌进行表型和基因型分析后,将其归类为一个新的 *Ketogulonigenium* 属,*vulgare* 种,即普通生酮基古龙酸杆菌(*K. vulgare*,*K.v*)。目前,工业上生产 VC 常用的伴生菌主要为原核微生物中的芽孢杆菌属,如巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)、苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*)和蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)[4]等,而用真核微生物作为伴生菌却鲜有报道。作者所在实验室筛选到 1 株能高效促进 *K. vulgare* 产2-KGA 的真核微生物——胶红酵母(*R. mucilaginosa*)。由于现有的发酵培养基是以某些芽孢杆菌作为伴生菌,其营养成分可能无法满足胶红酵母(*R.m*)与产酸菌(*K.v*)组成新菌系的生长与产酸。因此,作者采用响应面法对现有 VC 混菌发酵培养基成分进行优化,以充分发挥新菌系发酵潜力,最终提高 2-KGA 的产量。

1 材料与方法

1.1 试验材料与仪器

1.1.1 试验材料 土样:沈阳东陵龙尾湖淤泥;菌种:普通生酮基古龙酸菌(*K. vulgare*),作者所在实验室保存。

1.1.2 主要仪器设备 万分之一电子天平:赛多利斯科学仪器北京有限公司;LDZX-30KBS 立式压力蒸汽灭菌器:上海申安医疗器械厂;HPS-160 生化培养箱:哈尔滨市东联电子技术开发有限公司;HZQ-C 空气浴振荡器:哈尔滨市东联电子技术开发有限公司;BH-2 显微镜:OLYMPUS;ST2100 pH 计:奥豪斯仪器常州有限公司;JW-2017HR 高速冷冻离心机:安徽嘉文仪器装备有限公司;S1000™ Thermal Cycler:BIO-RAD;Universal Hood Ⅱ凝胶成像系统:BIO-RAD;DL-CJ-2ND-Ⅱ洁净工作台:北京东联哈尔滨仪器有限公司;JY600C 电泳仪:北京君意东方电泳设备有限公司。

1.1.3 培养基 基础发酵培养基(g/L):L-山梨糖 80,玉米浆 15, 尿素 12,KH_2PO_4 1,$MgSO_4$ 0.2,$CaCO_3$ 5;pH 6.7~7.0。

种子培养基(g/L):L-山梨糖 20,葡萄糖 2,尿素 1,玉米浆 5,$CaCO_3$ 1;pH 6.7~7.0。

YPD 培养基:酵母膏 1 g/dL,蛋白胨 2 g/dL,葡萄糖 2 g/dL。制备固体培养基,加入 2 g/dL 琼脂粉。

培养基所用试剂均为分析纯, 配制时均以 1 mol/L NaOH (HCl) 调节 pH 为 6.7, 然后再加入 $CaCO_3$ 搅拌均匀,L-山梨糖单独在 121 ℃灭菌 25 min。

1.2 试验方法

1.2.1 目标伴生菌的富集培养 取约 5 g 淤泥,放

入盛有 50 mL 无菌水的 150 mL 三角瓶中，振荡 30 min,将泥土上的微生物分散在无菌水中,4 ℃静置 1 h 后,取 100 μL 涂布在 YPD固体平板培养基上,28 ℃恒温倒置培养 2~3 d,从中挑选表面光滑的菌落(目标伴生菌)，于新的 YPD 固体平板培养基上划线培养，从长出的单菌落上挑取一环接种于装有 20 mL YPD 液体培养基的 250 mL 三角瓶中,180 r/min、28 ℃培养 24 h,得到待选的目标伴生菌的菌悬液。

1.2.2 目标伴生菌与产酸菌的混合发酵培养 取2 mL 经种子培养基活化的产酸菌 *K. vulgare*,接种于装有 20 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中，同时接入 0.5 mL 目标伴生菌的菌悬液,180 r/min、28 ℃混菌发酵培养 96 h 达到终点。

1.2.3 绘制目标伴生菌的菌株生长曲线 用 YPD 固体培养基对目标伴生菌菌株进行活化培养 24 h 后,10%接种于 20 mL YPD 液体培养基的 250 mL 三角瓶中,28 ℃、180 r/min 恒温振荡培养，每 3 小时取样1 mL 培养液,4 000 r/min 离心 5 min，取沉淀,加 1 mL 蒸馏水洗涤,4 000 r/min 离心 5 min,取沉淀,加 1 mL 蒸馏水混匀后,取样稀释,650 nm 波长下测 OD 值,以蒸馏水为对照。另以时间为横坐标,OD_{650} 值为纵坐标,绘制目标伴生菌菌株生长曲线。

1.2.4 2-酮基-L-古龙酸测定 采用碘量法测定[6]。

1.2.5 菌株初步鉴定 目标伴生菌的初步鉴定主要对照真菌鉴定手册[7],依据菌株的菌落形态和个体形态特征进行归类与鉴定。

1.2.6 菌株分子鉴定 形态学鉴定是传统的方法,为确保鉴定的准确性，需结合分子鉴定。利用 ITS (Internal Transcribed Spacer) 序列进行菌种鉴定是目前较多采用的方法。ITS 序列位于 rRNA 编码基因 18 S、5.8 S 和 28 S 之间的小基因片段,具有高拷贝数，整个序列的长度范围在 600~800 bp，利用 rDNA 通用引物能够很容易被扩增出来。因此,rDNA 在微生物的鉴定应用中,具有检测微生物种水平的多态性特征。

取目标伴生菌的菌悬液,按照文献[8]的方法提取基因组 DNA。PCR 引物为 ITS4/ITS5,ITS4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3';ITS5:5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' 由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 扩增 DNA,反应体系为 20 μL:MIX 混合液 10 μL,引物各 1 μL,模板 DNA 2 μL,ddH_2O 6 μL。PCR 反应程序为:94 ℃预变性 2 min,94 ℃变性 35 s,60 ℃退火 35 s,72 ℃延伸 1 min,30 个循环,72 ℃延伸 10 min,4 ℃保存。回收 PCR 产物并测序,以 BLAST 程序进行 DNA 序列比对。

1.2.7 响应面试验设计

1)单因素试验:以基础发酵培养基中各个成分为试验因素,通过固定其它成分因素不变,每次只研究一个变化因素来进行单因素试验。以基础发酵培养基中各个成分的不同添加量为试验水平，以 2-KGA 产量为试验指标,设计得到 6 因素 5 水平的因素水平表,见表 1。

表 1 单因素试验因素与水平

Table 1 Factors and levels in single factor test

水平	因素(g/L)					
	L-山梨糖	尿素	玉米浆	$CaCO_3$	$MgSO_4$	KH_2PO_4
1	60	8	5	1	0.1	0.6
2	70	10	10	3	0.2	0.8
3	80	12	15	5	0.3	1
4	90	14	20	7	0.4	1.2
5	100	16	25	9	0.5	1.4

2)响应面试验:在单因素试验的基础上,借助 Design Expert 8.0.6 软件,采用 Box-Behnken Design (BBD)[9-10]设计原理,选取 L-山梨糖、尿素、玉米浆、$CaCO_3$、$MgSO_4$、KH_2PO_4 添加量为试验因素，以 2-KGA 产量为指标,进行响应面分析,得到 6 因素 3 水平编码表,见表 2。

表 2 试验因素水平及编码

Table 2 Factors, levels and codes of response surface tests

自变量	代码		编码水平		
	未编码	编码	-1	0	1
L-山梨糖/(g/L)	X_1	x_1	80	90	100
尿素/(g/L)	X_2	x_2	10	12	14
玉米浆/(g/L)	X_3	x_3	15	20	25
$CaCO_3$/(g/L)	X_4	x_4	1	3	5
$MgSO_4$/(g/L)	X_5	x_5	0.2	0.3	0.4
KH_2PO_4/(g/L)	X_6	x_6	0.6	0.8	1.0

3)响应面模型验证试验:以响应面试验优化后的培养基条件进行 VC 混菌发酵,重复 3 次,所得平均值与系统预测值越接近则模型越可靠。

2　结果与分析

2.1　菌株的形态特征

按照 1.2.1 中的方法，筛选得到一株能够作为 *K. vulgare* 伴生菌的菌株，将其命名为 A8，以进行后续实验。

分离纯化后得到的菌株 A8，在 YPD 固体平板培养基上划线和涂布培养 3 d。通过菌落形态特征可知，菌株 A8 呈粉红色，菌落直径大小为 4~6 mm，边沿整齐，表面光滑、湿润、发亮、呈奶酪状，生长较快，质地细腻柔软，见图 1。在显微镜下观察菌株 A8 的细胞呈椭圆形，以出芽方式进行无性繁殖，见图 2。经形态特征初步鉴定，菌株 A8 属于酵母菌类。

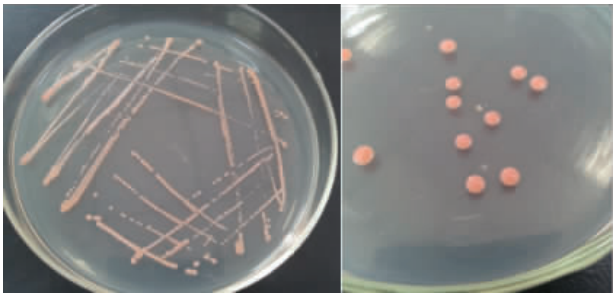


图 1　菌株 A8 的菌落形态

Fig. 1　Colony morphology of strain A8

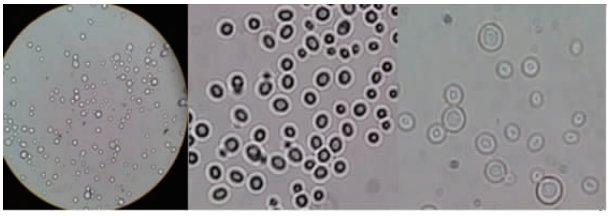


图 2　菌株 A8 的细胞形态

Fig. 2　Cell morphology of strain A8

2.2　菌株的分子鉴定

为进一步鉴定菌株 A8，以其基因组 DNA 为模板，利用真菌 ITS rDNA 通用引物 ITS4/ITS5 进行 PCR 扩增，电泳检测得到长度约为 750 bp 的 PCR 扩增产物，见图 3。从图 3 可知，DNA 的扩增效果较好，符合常规的 ITS rDNA 序列长度，可以用来测序。

将扩增的菌株 A8 ITS rDNA 序列送至北京六合华大基因科技股份有限公司测序，测序后去除载体及引物序列，共 610 bp，正向序列结果为：

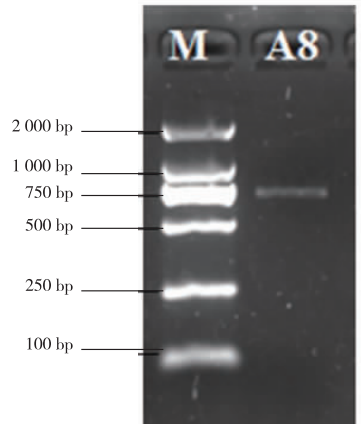


图 3　菌株 A8 ITS rDNA 的 PCR 产物电泳图谱

Fig. 3　Electrophoresis of PCR production of ITS rDNA from strain A8

CCG TAAACTACTGCGGAGACATTAGTGATAT
AGGACGTCCAACTTAACTTGGAGTCCGAACTCTCA
CTTTCTAACCCTGTGCACTTGTTTGGGATAGTAACT
CTCGCAAGAGAGCGAACTCCTATTCACTTATAAAC
ACAAAGTCTATGAATGTATTAAATTTTATAACAAA
ATAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGC
ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA
TGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAAT C T
TTGAACGCACCTTGCGCTCCATGGTATTCCGTG GA
GCATGCCTGTTTGAGTGTCATGAATACTTCAA CCC
TCCTCTTTCTTAATGATTGAAGAGGTGTTTGGT TTC
TGAGCGCTGCTGGCCTTTACGGTCTAGCTCGT TCG
TAATGCATTAGCATCCGCAATCGAACTTCGGATTG
ACTTGGCGTAATAGACTATTCGCTGAGGAATTCTA
GTCTTCGGATTAGAGCCGGGTTGGGTTAAAGGAA
GC TTCTAATCAGAATGTCTACATTTTAAGATTAGA
TCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAG
CATATCAATAAGCGGAGGAA

最后将测定的序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对分析，结果显示菌株 A8 的基因序列与胶红酵母菌（*Rhodotorula mucilaginosa*）同源性为 100%，结合形态学鉴定，确定菌株 A8 为胶红酵母菌，命名为（*Rhodotorula mucilaginosa* A8，*R. mucilaginosa* A8）。进一步查询，该菌在通常情况下对动物和人体不致病[11-13]。另外，为了研究菌株 A8 的发育系统在微生物种群中的地位，根据 BLAST 比对结果，下载同源性 99%以上序列，采用 MEGA 6.06 构建系统发育

树,见图 4。

2.3 菌株 A8 的生长特性

菌株 A8 在 28 ℃ YPD 液体培养基中生长,最初的 6 h 内生长比较缓慢,属于延滞期;6~18 h 其生长量呈对数增长,进入对数生长期;18~48 h 处于稳定阶段,此时菌株呈现波动性增长,48 h 时菌体生长量达到最大值,之后菌体生物量逐渐降低,进入衰亡期,见图 5。

2.4 单因素试验结果

按照表 1 进行单因素试验,得出了各试验因素成分添加量对 2-KGA 产量的柱形图。再根据 BBD 试验设计原理,选择在单因素试验中 2-KGA 产量最优的 3 个水平值进行后续响应面优化试验设计。

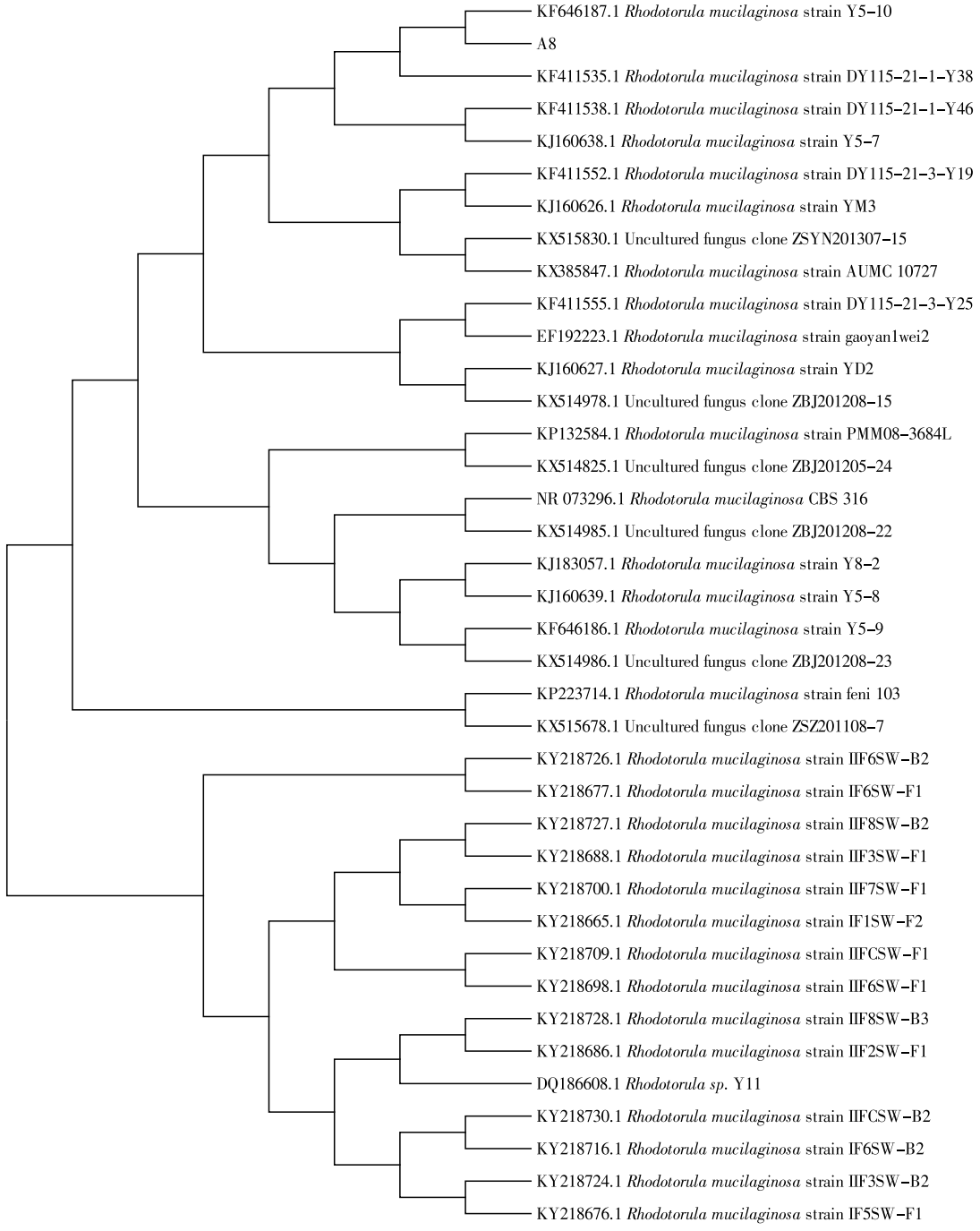


图 4 基于菌株 A8 ITS rDNA 序列构建系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic trees based on the ITS rDNA sequences of strain A8

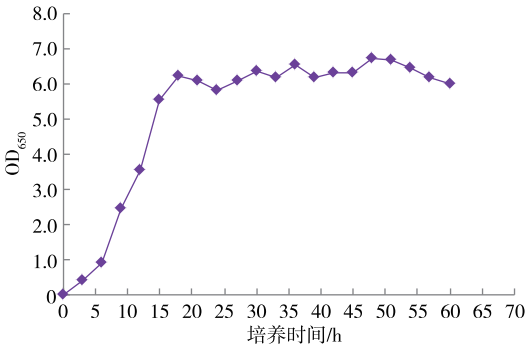


图 5　菌株 *R. mucilaginosa* A8 的生长曲线

Fig. 5　Growth curve of strain of *R. mucilaginosa* A8

2.4.1　L–山梨糖添加量对 2–KGA 产量的影响　L–山梨糖是混菌发酵生产 VC 前体 2–KGA 的原料。在工业生产中，投糖量过低会造成其他资源的浪费，而过高的糖质量浓度又会抑制发酵菌系的细胞生长与产酸。糖质量浓度在 100 g/L 时，2–KGA 产量最高，但与 80 g/L 和 90 g/L 的糖质量浓度比较，其酸产量相差不大，见图 6。按照 BBD 设计原理，选择糖质量浓度为 80、90、100 g/L 共 3 个水平进行后续设计。

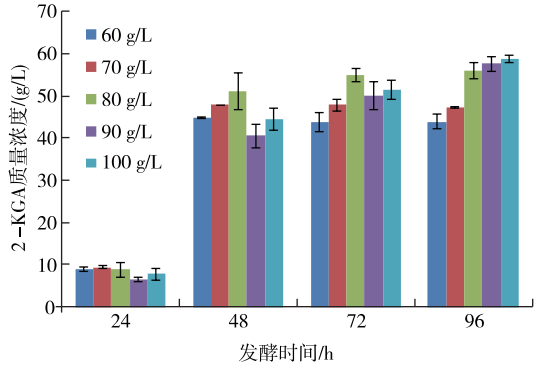


图 6　不同 L–山梨糖添加量对新菌系 *K.v+R.m* A8 产酸的影响

Fig. 6　Effect of L – sorbitol concentration on 2 –KGA production by a new mixed culture of *K.v + R.m* A8

2.4.2　尿素添加量对 2–KGA 产量的影响　在微生物生长过程中，尿素不仅作为氮源，而且也作为一种生理碱调节微生物生长的 pH 环境[14]。在发酵终点，不同尿素添加量对 2–KGA 产量影响较大，见图7。按照 BBD 设计原理，选择尿素质量浓度为 10、12、14 g/L 共 3 个水平进行后续设计。

2.4.3　玉米浆添加量对 2–KGA 产量的影响　玉米浆中含有多种氨基酸等物质供菌体生长，是影响 2–KGA 产量的重要因素之一[15]。在发酵终点时，玉米浆质量浓度对 2–KGA 产量没有太大影响，但是不同质量浓度的添加量可以起到缩短发酵周期的作用，见图 8。按照 BBD 设计原理，选择玉米浆质量浓度为 15、20、25 g/L 共 3 个水平进行后续设计。

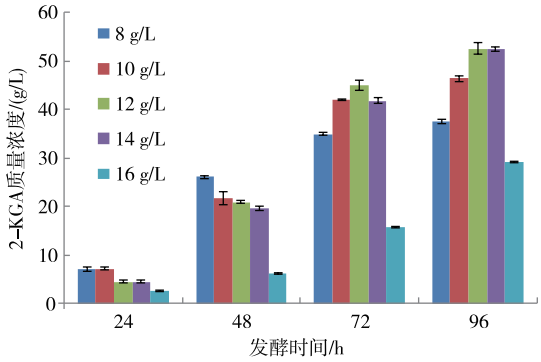


图 7　不同尿素添加量对新菌系 *K.v+R.m*A8 产酸的影响

Fig. 7　Effect of urea addition amount on 2–KGA production by a new mixed culture of *K.v + R.m* A8

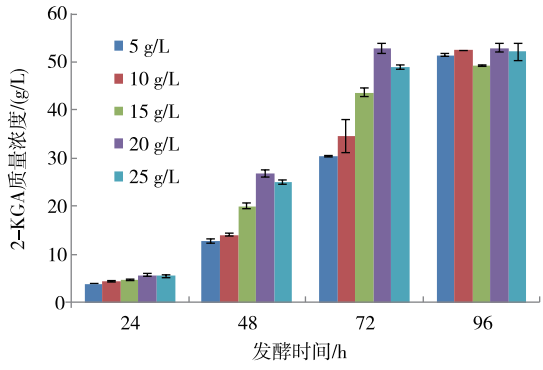


图 8　不同玉米浆添加量对新菌系 *K.v+R.m* A8 产酸的影响

Fig. 8　Effect of corn liquor amount on 2–KGA production by a new mixed culture of *K.v+R.m* A8

2.4.4　$CaCO_3$ 添加量对 2–KGA 产量的影响　在发酵培养基中添加 $CaCO_3$ 的主要目的是为了缓冲发酵液中的酸，避免造成酸的反馈抑制作用。不同的 $CaCO_3$ 添加量可以缩短发酵周期，见图 9。按照 BBD 设计原理，选择 $CaCO_3$ 质量浓度为 1、3、5 g/L 共 3 个水平进行后续设计。

2.4.5　$MgSO_4$ 添加量对 2–KGA 产量的影响　据文献报道[6,16–17]，2–KGA 在还原酶的作用下生成 L–艾杜糖酸，而高质量浓度的 $MgSO_4$ 可激活 2–KGA 还原酶，使 2–KGA 还原成 L–艾杜糖酸，导致 2–KGA 产量下降。$MgSO_4$ 质量浓度为 0.4 g/L 时，2–KGA 产量最高，见图 10。按照 BBD 设计原理，选择 $MgSO_4$ 质量浓度为 0.2、0.3、0.4 g/L 共 3 个水平进行后续设计。

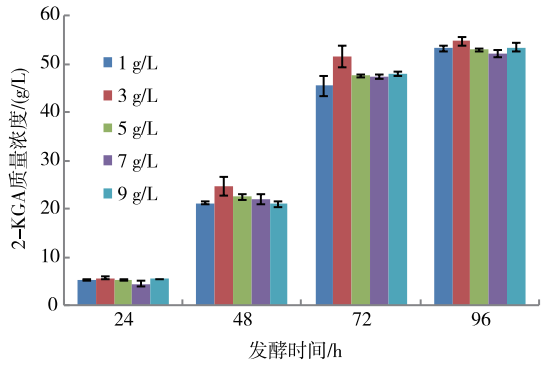


图 9　不同 $CaCO_3$ 添加量对新菌系 *K.v+R.m* A8 产酸的影响

Fig. 9　Effect of $CaCO_3$ amount addition on 2-KGA production by a new mixed culture of *K.v+R.m* A8

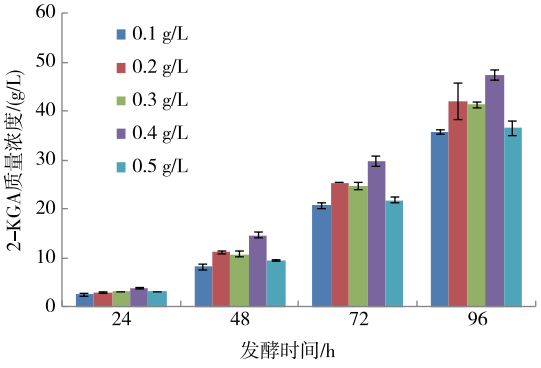


图 10　不同 $MgSO_4$ 添加量对新菌系 *K.v+R.m* A8 产酸的影响

Fig. 10　Effect of $MgSO_4$ amount on 2-KGA production by a new mixed culture of *K.v+R.m* A8

2.4.6　KH_2PO_4 添加量对 2-KGA 产量的影响　KH_2PO_4 是培养基中的常用成分，磷和钾促进芽孢的形成，且 K^+能调节细胞渗透压，保持酶活性，磷是核酸的重要组成元素，同时对 pH 值也有一定缓冲作用。在发酵终点时，不同 KH_2PO_4 添加量对 2-KGA 产量影响较大，见图 11。按照 BBD 设计原理，选择 KH_2PO_4 质量浓度为 0.6、0.8、1.0 g/L 共 3 个水平进行后续设计。

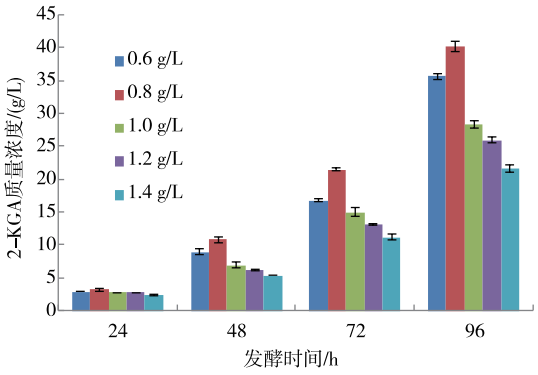


图 11　不同 KH_2PO_4 添加量对新菌系 *K.v+R.m* A8产酸的影响

Fig. 11　Effect of KH_2PO_4 amount on 2-KGA production by a new mixed culture of *K.v+R.m* A8

2.5　响应面试验结果

按照 1.2.7 中方法，采用 BBD 原理对表 2 中数据进行响应面设计，得到要分两批次进行的 54 组不同因素组合试验，试验结果见表 3。

对表 3 中的数据进行多项回归分析，获得 2-KGA 产量对 6 个编码自变量 L-山梨糖(x_1)、尿素(x_2)、玉米浆(x_3)、$CaCO_3$(x_4)、$MgSO_4$(x_5)、KH_2PO_4(x_6)的二次多项回归方程模型(1)：

表 3　BBD 实验设计及结果

Table 3　Design and results of Box-Behnken Design

试验号	批次	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	2-KGA 产量/(g/L)	
								实验值	预测值
1	Block 1	−1	−1	0	−1	0	0	47.69	46.88
2	Block 1	1	1	0	−1	0	0	56.15	58.50
3	Block 1	1	−1	0	1	0	0	46.92	47.74
4	Block 1	−1	1	0	1	0	0	65.38	66.09
5	Block 1	0	−1	−1	0	−1	0	50.38	50.58
6	Block 1	0	1	1	0	−1	0	66.15	66.08
7	Block 1	0	1	1	0	1	0	69.22	65.87
8	Block 1	0	−1	1	0	1	0	50.00	48.80
9	Block 1	0	0	0	−1	0	−1	55.38	56.54
10	Block 1	0	0	0	1	0	−1	60.76	60.66
11	Block 1	0	0	0	−1	0	1	57.69	59.27
12	Block 1	0	0	0	1	0	1	61.92	60.63

(续表 3)

试验号	批次	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	2-KGA 产量/(g/L)	
								实验值	预测值
13	Block 1	−1	0	−1	−1	−1	0	59.99	60.47
14	Block 1	1	0	−1	1	−1	0	56.15	55.95
15	Block 1	1	0	1	−1	1	0	56.15	54.52
16	Block 1	−1	0	1	1	1	0	60.38	60.39
17	Block 1	0	−1	−1	0	−1	−1	50.38	49.11
18	Block 1	0	1	1	0	1	−1	65.38	67.09
19	Block 1	0	1	−1	0	−1	1	69.22	68.13
20	Block 1	0	−1	1	0	1	1	49.23	49.12
21	Block 1	−1	0	0	0	0	−1	59.99	60.39
22	Block 1	1	0	0	0	0	−1	55.76	57.01
23	Block 1	1	0	0	0	0	1	55.76	56.97
24	Block 1	−1	0	0	0	0	1	59.99	59.84
25	Block 1	0	0	0	0	0	0	59.99	59.29
26	Block 1	0	0	0	0	0	0	59.99	59.29
27	Block 1	0	0	0	0	0	0	58.46	59.29
28	Block 2	1	−1	0	−1	0	0	41.92	42.50
29	Block 2	−1	1	0	−1	0	0	66.53	64.41
30	Block 2	−1	−1	0	1	0	0	47.69	46.64
31	Block 2	1	1	0	1	0	0	61.53	61.04
32	Block 2	0	1	−1	0	−1	0	60.76	63.45
33	Block 2	0	−1	−1	0	−1	0	45.38	47.25
34	Block 2	0	−1	1	0	1	0	47.69	49.25
35	Block 2	0	1	1	0	1	0	68.46	66.76
36	Block 2	0	0	0	−1	0	−1	56.15	55.85
37	Block 2	0	0	0	1	0	−1	59.23	59.23
38	Block 2	0	0	0	−1	0	1	59.99	58.51
39	Block 2	0	0	0	1	0	1	58.46	58.88
40	Block 2	1	0	−1	−1	−1	0	53.84	52.54
41	Block 2	−1	0	−1	1	−1	0	58.07	58.40
42	Block 2	−1	0	1	−1	1	0	55.38	56.88
43	Block 2	1	0	1	1	1	0	58.07	58.90
44	Block 2	0	1	−1	0	−1	−1	63.84	62.45
45	Block 2	0	−1	1	0	1	−1	50.38	49.99
46	Block 2	0	−1	−1	0	−1	1	50.00	49.78
47	Block 2	0	1	0	0	1	1	63.84	66.60
48	Block 2	1	0	−1	0	0	−1	55.38	53.95
49	Block 2	−1	0	1	0	0	−1	57.69	58.06
50	Block 2	−1	0	−1	0	0	1	60.38	60.72
51	Block 2	1	0	1	0	0	1	58.84	56.86
52	Block 2	0	0	0	0	0	0	57.69	58.14
53	Block 2	0	0	0	0	0	0	56.15	58.14
54	Block 2	0	0	0	0	0	0	59.99	58.14

$Y=58.71-1.78x_1+8.28x_2-0.032x_3+1.15x_4+0.42x_5+0.62x_6-0.96x_1x_2+0.77x_1x_3+0.79x_1x_4+0.82x_1x_5+0.096x_1x_6+0.91x_2x_3-0.096x_2x_4+0.36x_2x_5+0.67x_2x_6-0.048x_3x_4+0.14x_3x_5-0.22x_3x_6+0.82x_4x_5-0.72x_4x_6-0.96x_5x_6-1.46x_1^2-2.29x_2^2+0.096x_3^2-0.74x_4^2+0.74x_5^2+0.62x_6^2$

式中，Y：2-KGA 质量浓度（g/L）；x_1：L-山梨糖质量浓度(g/L)；x_2：尿素质量浓度(g/L)；x_3：玉米浆质量浓度(g/L)；x_4：$CaCO_3$ 质量浓度(g/L)；x_5：$MgSO_4$ 质量浓度(g/L)；x_6：KH_2PO_4 质量浓度(g/L)。

2.5.1 *回归方程方差分析* 对模型方程回归系数进行显著性检验分析，结果见表 4。

对模型方差分析结果表明，相关系数 R^2=0.954 6，校正系数 R^2_{Adj}=0.905 5，本实验所选用模型(1)具有极度显著性(P<0.000 1)，说明该方程与实际情况拟

表 4 回归方程方差分析

Table 4 Analysis of variance for the fitted regression equation with 2-KGA yield as a function

方差来源	平方和	自由度	均方和	F 值	P 值	显著性
Model	1 935.01	27	71.67	19.45	< 0.000 1	***
x_1	75.93	1	75.93	20.60	0.000 1	***
x_2	1 647.19	1	1 647.19	446.99	< 0.000 1	***
x_3	0.02	1	0.02	0.01	0.935 5	
x_4	31.95	1	31.95	8.67	0.006 9	**
x_5	4.17	1	4.17	1.13	0.297 8	
x_6	9.37	1	9.37	2.54	0.123 3	
x_1x_2	7.40	1	7.40	2.01	0.168 9	
x_1x_3	4.73	1	4.73	1.28	0.267 8	
x_1x_4	10.07	1	10.07	2.73	0.110 9	
x_1x_5	5.34	1	5.34	1.45	0.239 8	
x_1x_6	0.07	1	0.07	0.02	0.888 5	
x_2x_3	6.67	1	6.67	1.81	0.190 5	
x_2x_4	0.07	1	0.07	0.02	0.888 5	
x_2x_5	2.08	1	2.08	0.56	0.459 5	
x_2x_6	3.62	1	3.62	0.98	0.330 9	
x_3x_4	0.02	1	0.02	0.01	0.944 1	
x_3x_5	0.17	1	0.17	0.05	0.833 4	
x_3x_6	0.75	1	0.75	0.20	0.656	
x_4x_5	5.34	1	5.34	1.45	0.239 8	
x_4x_6	4.16	1	4.16	1.13	0.298 2	
x_5x_6	7.40	1	7.40	2.01	0.168 9	
x_1^2	21.87	1	21.87	5.93	0.022 3	*
x_2^2	54.01	1	54.01	14.66	0.000 8	**
x_3^2	0.10	1	0.10	0.03	0.873 7	
x_4^2	5.59	1	5.59	1.52	0.229 6	
x_5^2	5.59	1	5.59	1.52	0.229 6	
x_6^2	4.02	1	4.02	1.09	0.306 4	
残差	92.13	25	3.69			
失拟性	83.06	21	3.96	1.74	0.315 1	
纯误差	9.07	4	2.27			

注：*** 差异极显著(P< 0.001)；** 差异高度显著(P<0.01)；* 差异显著(P<0.05)。

合良好，可以用该方程代替真实实验点进行分析。对回归方程系数进行显著性检验，x_1、x_2 对产酸有极显著影响（$P<0.001$），x_4、x_2^2 对产酸有高度显著影响（$P<0.01$），x_1^2 对产酸有显著影响（$P<0.05$），其他项系数均不显著。依据系数估计值，因素的主效应关系为：$x_1=1.78$，$x_2=8.28$，$x_3=0.032$，$x_4=1.15$，$x_5=0.42$，$x_6=0.62$，尿素>L-山梨糖> $CaCO_3$> KH_2PO_4> $MgSO_4$>玉米浆。在 $\alpha=0.05$ 显著水平下剔除不显著项后，对模型(1)进行优化可得模型(2)：

$$Y=58.71-1.78x_1+8.28x_2+1.15x_4-0.96x_1x_2+0.79x_1x_4-0.096x_2x_4-1.46x_1^2-2.29x_2^2+0.096x_3^2-0.74x_4^2+0.74x_5^2+0.62x_6^2$$

式中，Y：2-KGA 质量浓度（g/L）；x_1：L-山梨糖质量浓度(g/L)；x_2：尿素质量浓度(g/L)；x_3：玉米浆质量浓度(g/L)；x_4：$CaCO_3$ 质量浓度(g/L)；x_5：$MgSO_4$ 质量浓度(g/L)；x_6：KH_2PO_4 质量浓度(g/L)。

2.5.2　响应面分析与优化　根据 BBD 模型探讨各因素及其交互作用对 2-KGA 产量的影响。选取显著性影响因素 L-山梨糖、尿素、$CaCO_3$ 为研究对象，得出两因素交互作用对产酸影响的 3D 曲面图，见图 12。可知，低水平和高水平的影响因素都不利于酸产量的提高，其中尿素对酸产量的影响最为显著，表现为曲线较陡。在各因素中，尿素与 L-山梨糖的交互作用最为显著，从变化速率来看，尿素组分的主效应大于 L-山梨糖。由此可知，在试验水平内，适当的增加尿素添加量有利于酸产量的提高。

2.5.3　响应面模型验证试验结果　为了检验响应面模型预测值的准确性，利用优化后的发酵培养基条件（L-山梨糖 80 g/L、尿素 14 g/L、玉米浆 15 g/L、$CaCO_3$ 1.58 g/L、$MgSO_4$ 0.3 g/L、KH_2PO_4 1.0 g/L）进行 3 组平行试验，产酸量分别为 69.85、70.27、70.12 g/L，平均值为 70.08 g/L，与模型预测值 70.38 g/L 基本一致，说明试验所用模型能够较好地预测实际发酵产酸情况。

3　结　语

经形态学鉴定和分子鉴定，确定新筛选出的伴生菌株 A8 为胶红酵母（*R. mucilaginosa*）。菌株 A8 在最初的 6 h 内生长处于延滞期；6~18 h 处于对数生长期；18~48 h 处于稳定期，48 h 之后进入衰亡期。通过单因素试验优化、响应面法分析以及试验验证，得出新菌系发酵培养基为：L-山梨糖 80 g/L、尿素 14 g/L、玉米浆 15 g/L、$CaCO_3$ 1.58 g/L、$MgSO_4$ 0.3 g/L、KH_2PO_4 1.0 g/L。利用优化后的培养基对新菌系进行 VC 混菌发酵，2-KGA 产量为 70.08 g/L，转化率达 81.3%，

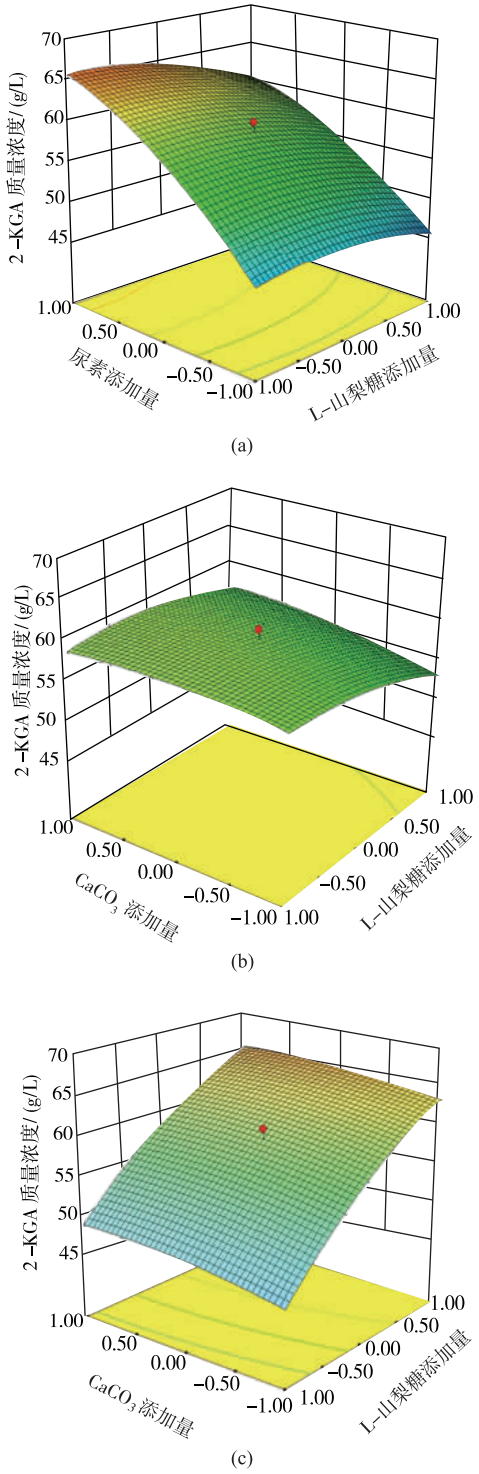


图 12　两因素交互作用对 2-KGA 产量的影响

Fig. 12　Effect of cross-interaction between two factors on 2-KGA production

显著高于工业生产菌系 *G. oxydans*+*B. megaterium* 2980 的产酸质量浓度 55.38 g/L[17]。在二步发酵法研究初期，从 L-山梨糖到 2-KGA 的转化率仅为 39.7%[18]。仲崇斌等[19]以掷孢酵母作为伴生菌与氧化葡萄糖酸杆菌组成新混菌体系，转化率达 66.81%。徐婷婷等[20]以短小芽胞杆菌 HJ-04 为伴生菌进行混菌产酸研究，在发酵终点 48 h 时，产酸质量浓度达 76.9 mg/mL(糖质量浓度 94.95 mg/mL)，转化率约为 75.2%。吕淑霞等[18]以枯草芽孢杆菌 A9 为伴生菌进行发酵产酸研究时，糖酸转化率达到了 94%左右。郭礼强等[21]利用紫外线(UV)、亚硝基胍(NTG)及两者的复合诱变方法选育得到一株苏云金芽孢杆菌 UN-366，转化率达到 89.2%。在促 *K. vulgare* 产酸能力及转化率方面，胶红酵母 A8 显著高于 *B. megaterium* 2980、掷孢酵母以及短小芽胞杆菌 HJ-04，而与枯草芽孢杆菌 A9 比较则较弱，因此，接下来应着手于胶红酵母 A8 和枯草芽孢杆菌 A9 的对比研究，找出真核微生物和原核微生物促产酸能力差异的原因。另外，经诱变后的苏云金芽孢杆菌 UN-366 能使转化率达到 89.2%，后续可以借鉴此方法来对胶红酵母 A8 进行诱变处理，以更进一步提升其促进 *K. vulgare* 产酸的能力。最后伴生菌株胶红酵母 A8 在通常情况下对动物和人体不致病，可以与 *K. vulgare* 组成新菌系，用于工业生产。

参考文献：

[1] BREMUS C,HERRMANN U S,SAHM H. The use of microorganisms in L-ascorbic acid production[J]. Journal of Biotechnology, 2006,124(1):196-205.

[2] YIN Guanglin,TAO Zengxin,YU Longhua,et al. Study on L-sorbose fermentation to produce vitamin C precursor 2-keto-L-gulonic acid Ⅰ. isolation,screening and identification of strains[J]. **Acta Microbiologica Sinica**,1980,20(3):246-251.(in Chinese)

[3] URBANCE JW,BRATINA BJ,STODDARD SF,et al. Taxonomic characterization of *Ketogulonigenium vulgare* gen. nov.,sp. nov.and *Ketogulonigenium robustum* sp nov.,which oxidize L-sorbose to 2-keto-L-gulonic acid [J]. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**,2001,51(3):1059-1070.

[4] HAN Xiaodong,ZHANG Weicai,ZHANG Tong. Progress in vitamin C fermentation [J]. **Letters in Biotechnology**,2009,20(3):433-435+454.(in Chinese)

[5] WANG Liyan,ZHU Shuquang,LU Yan,et al. Isolation of rhodotorulamucilaginosa from coal and the characteristics as coal surface modifier[J]. **Journal of China Coal Society**,2012,37(S2):478-484.(in Chinese)

[6] JIANG Yuyang,GUO Zhenyong,ZHANG Chenggang. Purification of 2-keto-L-gulonic acid reductase and its physicochemical and enzymatic properties[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**,1997,13(4):400-405.(in Chinese)

[7] 魏景超.真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979.

[8] PETERSON S W,KURTZMAN C P. Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeast[J]. **Syst Appl Microbiol**,1991,14(1):124－129.

[9] QIAO Yanming, CHEN Wenqiang, DENG Baiwan, et al. Microwave-assisted extraction of polysaccharides from polyporusumbellatus optimized by box-behnken design-response surface methodology[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2015,34(9):986-994.(in Chinese)

[10] LIANG Juan,PAN Jian,GE Mei,et al. Optimization of high-pressure processing to retain fibrinolytic activity and reduce allergenicity of pineapple juice by response surface methodology[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2017,36(1):15-21.(in Chinese)

[11] XU Zhanli,ZHANG Hongyin,HUANG Xingyi. Study on acute and genetic toxicities of *Rhodotorula mucilaginosa*[J]. **Science and Technology of Food Industry**,2010,31(12):303-305.(in Chinese)

[12] ZHU Min,LI Li,ZHANG Qiangqiang,et al. Fungemia due to *Rhodotorula mucilaginosa*:clinical and experimental stu dy [J]. **Chinese Journal of Mycology**,2009,4(4):207-210.(in Chinese)

[13] 王立艳. 褐煤中微生物筛选及胶红酵母对细粒煤的表面改性作用[D]. 北京:中国矿业大学,2012.

[14] WANG Jing,FENG Wenliang,WANG Lili,et al. Promotion effect of *Bacillus mgaterium* on *Ketogulongenium vulgare* in two-step fermentation of vitamin C[J]. **Chinese Journal of Bioprocess Engineering**,2009,7(1):24-28.(in Chinese)

[15] ZHANG J，ZHOU J W，LIU J，et al. Development of chemically defined media supporting high cell density growth of *Ketogulonicigenium vulgar* and *Bacillus megaterium*[J]. **Bioresource Technology**，2011，102：4807-4814.
[16] YANG Tao，ZHU Xinjie，ZHANG Zhixiong，et al. The effect of $MgSO_4$ on 2-Keto-L-gulonic acid fermentation[J]. **Journal of Shanghai Jiaotong University**，2008，42(9)：1458-1465.(in Chinese)
[17] LV Shuxia，GAO Ming，MA Di，et al. Optimization of medium composition for two-step fermentation of vitamin C using response surface methodology[J]. **Food Science**，2013，34(3)：202-206.(in Chinese)
[18] YAN Zizheng，TAO Zengxin，YU Longhua，et al. Production of 2-keto-*L*-gulonic acid by fermentation of L-sorbose：a precursor of vitamin C Ⅱ. Study on fermentation conditions[J]. **Acta Microbiologica Sinica**，1981，21(2)：185-191.
[19] ZHONG Congbin，ZHANG Zhongze，ZHANG Wenge，et al. Study of *Sporoblomyces roseus* on production of vitamin C precursor-2-keto-gulonic acid[J]. **Biotechnology**，2004，14(1)：45-47.(in Chinese)
[20] XU Tingting，GAO Ming，LV Shuxia，et al. Response surface methodology to optimize medium for 2-keto-L-gulonate production by new strains system in two-step vitamin C fermentation[J]. **Journal of Microbiology**，2012，32(2)：47-53.(in Chinese)
[21] GUO Liqiang，GUO Lige，LU Yuxin，et al. Breeding of associated bacteria *Bacillus thuringignsis* in "two-step fermentation" of VC [J]. **Journal of Hebei University：Natural Science Edition**，2006，26(1)：108-111.(in Chinese)

科　技　信　息

欧盟授权奇亚籽作为新食品原料用于面包等产品

2020 年 1 月 14 日，据欧盟官方公报消息，1 月 13 日，欧盟委员会发布法规(EU)2020/24，根据欧洲议会和理事会法规(EU)2015/2283，授权将源自茨欧鼠尾草的奇亚籽[china seeds(*Salvia hispanica*)]作为新食品原料用于面包类等多种产品，并修改欧盟委员会实施细则(EU)2017/2470 附件中的相应内容。同时，要求产品标签需标识该新食品原料成分。

该法规在欧盟官方公报公布后第 20 日生效。

(EU)2017/2470 附表 1 中的"奇亚籽"条目由以下内容代替：

新食品成分	指定食品类别	最大使用限量
奇亚籽	面包产品	5%(完整或碾碎奇亚籽)
	烘焙产品	10%完整奇亚籽
	谷物早餐	
	基于谷物、准谷物和/或豆类的灭菌即食食品	5%完整奇亚籽
	水果、坚果和种子的混合产品	
	预先包装的奇亚籽	
	糖果(包括巧克力及其制品、不包括口香糖)	
	乳制品(包括酸奶)	
	食用冰	
	水果和蔬菜产品(包括水果酱，带有/不带有谷物的蜜饯，用于加料或与乳制品混合的水果制剂，水果甜点，椰奶混合水果)	
	非酒精饮料(包括果汁和水果/蔬菜混合饮料)	
	布丁(指在其制造、加工或制备过程中不需要在 120 ℃或更高温度下进行热处理的布丁)	