

D-异抗坏血酸间接发酵法的研究

1. 2-酮基-D-葡萄糖酸产生菌的筛选及其产物的提取和鉴定*

蒋明珠 白照熙 汪崇林 许鸿发** 韩瑞环

(山西省生物研究所, 太原)

D-异抗坏血酸 (D-isoascorbic acid), 又名赤藻糖酸, D-阿拉伯(糖型)抗坏血酸, 异维生素 C, 是一种有很强还原性的有机酸, L-抗坏血酸的一种旋光异构体。在国外, D-异抗坏血酸及其钠盐, 作为抗氧化剂广泛用于肉类、冻鱼、蔬菜、酒类、饮料、罐头等食品工业^[1,2]。日本在 1961 年指定它为食品添加剂。

目前国外多采用间接发酵法制备 D-异抗坏血酸, 它的成本比 L-抗坏血酸低。所用前体为 2-酮-D-葡萄糖酸。1940 年 Stubbs, J. J. 等人^[3] 分离得到 2-酮-D-葡萄糖酸产生菌, 并使 D-异抗坏血酸的研究工业化^[4]。目前国内未见 D-异抗坏血酸间接发酵法的研究报道。

材 料 和 方 法

一、菌种的分离和筛选

1. 菌种: 从污水沟和菜园土壤中, 分离出细菌 136 株。中国科学院微生物研究所提供保藏细菌 22 株, 共 158 株菌。

2. 培养基: ①分离及保藏培养基(克): 牛肉膏 3, 蛋白胨 10, NaCl 5, 琼脂 20, 自来水 1 升, pH6.7。②酚红琼脂斜面培养基(克): 蛋白

胨 10, 葡萄糖 8, NaCl 5, 琼脂 15, 自来水 1 升, pH7.4, 酚红 0.018。③葡萄糖酵母膏培养基(克): 葡萄糖 20, 酵母膏 5, 自来水 1 升, pH6.7。④种子培养基(克): 葡萄糖 10, 酵母膏 3, 蛋白胨 10, 牛肉膏 3, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 3, 自来水 1 升, pH6.7。⑤发酵培养基(克): 葡萄糖 200, 玉米浆 18, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25, K_2HPO_4 0.6, KH_2PO_4 0.5, 尿素 2, $CaCO_3$ 50, 自来水 1 升, pH6.7。

3. 分离方法: 用平板涂抹分离, 挑取单菌落保存。

4. 筛选方法: ①初筛: 将分离到的菌株接入酚红琼脂斜面, 若培养基由红变黄, 则该菌可进行复筛。②复筛: 将初筛后留下的菌株, 接入保藏培养基中。28℃ 培养 24 小时, 使其活化, 取一环菌苔接入葡萄糖酵母膏培养基 (250 ml 三角瓶装量 25ml)。28—30℃ 培养 48 小时。用纸层析法定性, 凡产生 2-酮-D-葡萄糖酸的菌株, 可用来进行三筛。③将通过初、复筛的菌

* 红外光谱由太原制药厂欧阳中林测定, 紫外吸收光谱由本所杨坪荣测定, 荧光假单胞菌 K1005 发酵产品经化学转化制备的 D-异抗坏血酸钠, 由太原制药厂提供。

** 许鸿发发现在安徽省生物研究所。

株活化后,取一环菌苔接入种子培养基(250ml三角瓶装量25ml),28—30℃振荡培养24小时左右,按8%接种量接入发酵培养基中(装量同上)。28—30℃振荡培养64小时左右,测定2-酮-D-葡萄糖酸含量。

二、分析方法

- 1. pH: 用国产精密 pH 试纸测定。
- 2. 发酵液中 2-酮-D-葡萄糖酸的定性测定: 参照 Koespell, H. J. 等人^[5]的方法,用纸层析法进行。展开剂为正丁醇:吡啶:水(3:2:1.5, v/v),上行展开,展层后用 0.2% 邻苯二胺酒精溶液显色。2-酮-D-葡萄糖酸为深橄榄绿色。
- 3. 发酵液中 2-酮-D-葡萄糖酸的定量: 参照 Stubbs, J. J. 等人^[3]的方法。

实验结果

一、2-酮-D-葡萄糖酸产生菌的筛选

通过对 158 株细菌的筛选,得到 27 株产 2-酮-D-葡萄糖酸的菌株,其分类及产酸结果见表 1。

表 1 2-酮-D-葡萄糖酸产生菌及其产量

结果 菌名	项目	菌株数(以 g/100ml 产酸量计)			总计 (株)
		<10	>10	>15	
荧光假单孢菌		3	8	3	14
卵状假单孢菌		1		1	2
恶臭假单孢菌		2			2
粘质沙雷氏菌		1	1		2
其它细菌				7	7

表 1 说明,27 株菌中有 11 株产酸量达 15 g/100ml 以上,有 9 株达 10g/100ml 以上,7 株在 10g/100ml 以下。其中高产菌株产酸结果见表 2。

为进一步了解所得菌株的发酵产酸能力,我们用 6 L 自控玻璃罐进行发酵试验。玻璃罐投料体积 3 L 左右,葡萄糖浓度 18—20%。供试菌株为荧光假单孢菌 K1005。罐温 28℃,通

表 2 几株高产菌株摇瓶发酵试验

项目 结果 菌名	总还原 铜值 (mg)	旋光值 (分米·度)	2-酮-D-葡萄糖酸 (g/100ml)	对糖的 转化率 (%)
荧光假单孢菌 K1005	315.46	-13.35	16.04	88.0
荧光假单孢菌 K1007	346.62	-13.65	16.87	92.8
卵状假单孢菌 K1028	328.80	-13.30	16.28	91.7
细菌 K1018	311.64	-13.05	15.74	86.6
细菌 K1020	303.37	-13.65	16.02	85.1

气量 1:1 (V/V/m),罐压 0.5kg/cm²,结果见表 3。

表 3 玻璃罐上的试验结果

项目 结果 罐批号	发酵时 间 (小时)	放罐 体积 (L)	2-酮-D-葡萄糖酸 钙* (g/100ml)	对糖的 转化率 (%)
1	48	2.6	20.0	80.5
2	52	3.2	18.5	91.6
3	44	3.4	16.4	86.3
4	44	3.1	19.3	92.6

* 转化法测定:以标准样品作对照,用 5NH₂SO₄ 转化,碘滴定测出口昇抗坏血酸含量,再换算出 2-酮-D-葡萄糖酸钙的含量。

表 3 说明,荧光假单孢菌 K1005 对糖的转化率达 80.5—92.6%,发酵液中 2-酮-D-葡萄糖酸钙达 16.4—20g/100ml。该菌株产 2-酮-D-葡萄糖酸活性稳定。

二、2-酮-D-葡萄糖酸钙的提取和鉴定

1. 2-酮-D-葡萄糖酸钙的提取: 发酵液 80℃ 水浴加热 15 分钟,再加入 0.2% 活性炭脱色半小时,离心。上清液在 55℃ 以下减压浓缩,使浓缩液中的 2-酮-D-葡萄糖酸钙的含量达 40% 以上。冷却得 2-酮-D-葡萄糖酸钙的白色结晶。

2. 2-酮-D-葡萄糖酸钙的鉴定: ①纸层析: 培养基用葡萄糖酵母膏。发酵 48 小时之后,取发酵液离心,离心液和 2-酮-D-葡萄糖酸钙标准品(美国产品,1% 水溶液,经草酸脱钙),分别点样于 Watman No. 1 号滤纸上,展开显色后, Rf 值和标准样品一致,呈深橄榄绿色,见图 1。②紫外吸收光谱: 用荧光假单孢

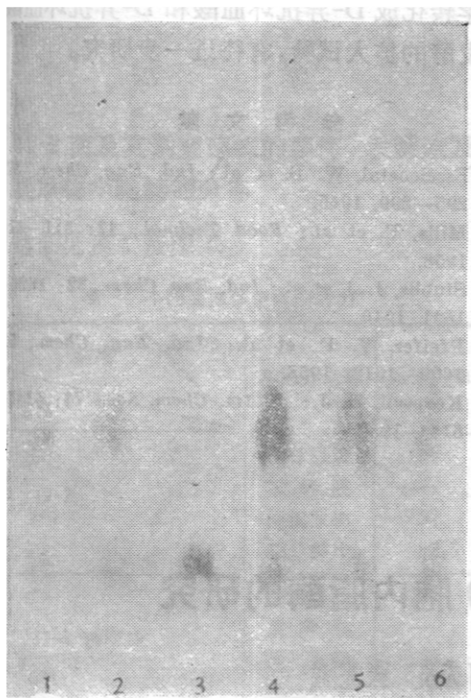


图1 2-酮-D-葡萄糖酸发酵液纸层析图谱*

* 图中上排为葡萄糖斑点；下排为 2-酮-D-葡萄糖酸斑点。1 为卵状假单孢菌 K1027, 2 为细菌 K1022, 3 为标准样品, 4 为恶臭假单孢菌 K1025, 5 为荧光假单孢菌 K1005, 6 为粘质沙雷氏菌 K1027。

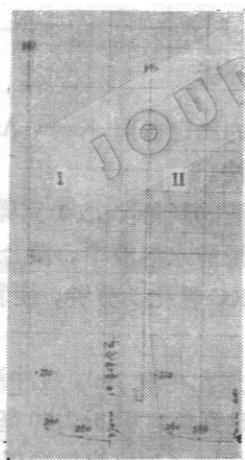


图2 发酵产品的紫外吸收光谱*

* 图中 I 为 K1005 菌的发酵产品, 2 为标准样品。

菌 K1005 发酵液提取的结晶, 作紫外吸收光谱分析, 结果说明吸收峰与 2-酮-D-葡萄糖酸钙标准品一致, 见图 2。③红外吸收光谱: 荧光假单孢菌 K1005 的发酵产物与 2-酮-D-葡萄糖酸钙标准样品吸收峰一致, 见图 3。

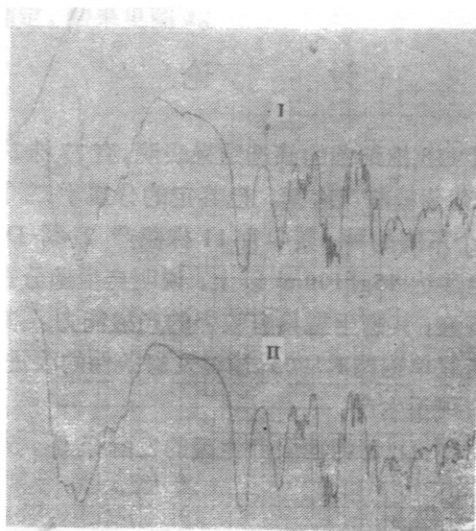


图3 发酵产品的红外吸收光谱*

* 图中 I 为 K1005 菌发酵产品, 2 为标准样品。

为进一步对发酵产物鉴别, 将上述菌株发酵生成的 2-酮-D-葡萄糖酸钙经化学转化成 D-异抗坏血酸钠盐, 与日本产 D-异抗坏血酸钠盐进行红外吸收光谱对比测定。结果表明它们的吸收峰相符, 见图 4。

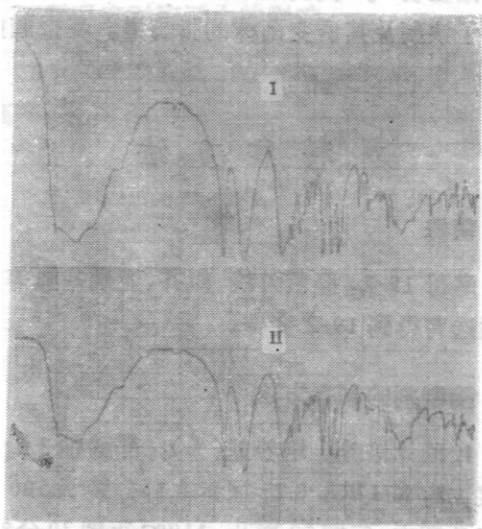


图4 D-异抗坏血酸钠的红外吸收光谱*

* 图中 I 为 K1005 菌发酵产品经化学转化成的 D-异抗坏血酸钠, 2 为日本产的标准样品。

上述结果证明, 荧光假单孢菌 K1005 以葡萄糖为原料, 经发酵、提取后的结晶, 是 2-酮-D-葡萄糖酸钙。

讨 论

对 158 株细菌的筛选结果表明,有 27 株 2-酮-D-葡萄糖酸产生菌,已鉴定的分属于二个属,4 个不同的种,其中有 11 株菌产 2-酮-D-葡萄糖酸达 15g/100ml 以上,说明产生菌分布较为普遍,其野生型具有较强的产酸能力。其中萤光假单孢菌 K1005,通过发酵条件的改进,可望应用于生产。

2-酮-D-葡萄糖酸产生菌的发酵条件,产

物化学转化成 D-异抗坏血酸和 D-异抗坏血酸间接发酵的扩大试验,有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Esselenetal, W. B. et al.: *Ind. Eng. Chem.* 37: 295—299, 1945.
- [2] Mills, F. et al.: *Food Technol.*, 12: 311—314, 1958.
- [3] Stubbs, J. J. et al.: *Ind. Eng. Chem.*, 32: 1626—1631, 1940.
- [4] Pfeifer, V. F. et al.: *Ind. Eng. Chem.*, 52: 1009—1012, 1958.
- [5] Koepsell, H. J.: *J. Am. Chem. Soc.*, 74: 5142—5144, 1952.