

食品抗氧化剂-D-异抗坏血酸的研究

II. 产酮产碱菌 E54 产生 2-酮基-D-葡萄糖酸的发酵条件*

曹桂芳 梁改芹 尹光琳**

(中国科学院微生物研究所, 北京)

摘要 2-酮基-D-葡萄糖酸是合成 D-异抗坏血酸(简称异维生素 C)的前体。而 D-异抗坏血酸及其钠盐是广泛应用于食品工业中的优良抗氧化剂。本文通过新种产酮产碱菌使葡萄糖发酵产生 2-酮基-D-葡萄糖酸, 并对该菌发酵的碳源、氮源、通气量、温度、金属离子等影响作了探讨, 通过正交试验确定了产生 2-酮基-D-葡萄糖酸最佳种子培养基和发酵培养基。并对该菌的发酵代谢作了初步的观察。

关键词 D-异抗坏血酸, 产酮产碱菌, 2-酮基-D-葡萄糖酸

由于 2-酮基-D-葡萄糖酸(简称 2-DGA)是食品抗氧化剂(异维生素 C)的重要前体, 随着食品工业的发展, 由葡萄糖经微生物发酵制备 2-DGA 已日益引起重视。自 1935 年 Bernhauser 和 Görlich^[1] 从葡萄糖醋杆菌(*Acetobacter gluconium*)的发酵液中分离到 2-DGA 以来,

国外研究甚多^[2,3], 近几年来国内也进行了这方面的研究工作^[4]。

前文^[6]已报道了产生异维生素 C 前体 2-

* 本文请黄和容和叶绪慰先生审阅并提出宝贵意见, 刘庆臣同志参加部份工作, 一并致谢。

** 现在工作单位: 上海交通大学生物科技系。

DGA 的优良菌株的筛选和产物鉴定,在此基础上,我们进行了一系列摇瓶发酵条件试验,使 2-DGA 的产量大幅度提高,为扩大试验提供了依据,本文主要报道产酮产碱菌 (*Alcaligenes ketogenes* nov. sp. Yin et Cai) E54^[5] 产生 2-酮基-D-葡萄糖酸的发酵条件。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

产酮产碱菌 E54。

(二) 培养基及培养方法

1. 斜面培养基组分(%)：蛋白胨 1.0, NaCl 0.5 牛肉膏 0.3, 琼脂 2.0—2.5, 自来水配制, pH 7.0—7.2, 分装试管, 15 磅 30 分钟高压灭菌。

2. 种子培养基组分(%)：葡萄糖 1.0, 酵母膏 0.3, 蛋白胨 1.0, MgSO₄ · 7H₂O 0.1, NaCl 0.25, 自来水配制, pH 7.0, 250 ml 三角瓶装 20ml, 8 磅 30 分钟高压灭菌。

3. 发酵培养基组分(%)：葡萄糖 16.0, 尿素 0.1, 玉米浆 1.0, CaCO₃ 4.5, KH₂PO₄ 0.1, MgSO₄ · 7H₂O 0.02, 自来水配制, pH7.0, 250 ml 三角瓶装 25ml, 8 磅 30 分灭菌。

4. 培养方法：斜面于 28℃ 培养 24 小时, 取菌苔一环接入种子培养液中, 28℃ 振荡培养 24 小时, 再按 2% 的接种量接入发酵培养基中, 振荡培养 72 小时。用旋转式摇床 (转速 190 r/min, 偏心距 2.5cm)。

(三) 分析方法

1. 用国产精密 pH 试纸测定 pH。

2. 发酵液 2-DGA 的定性和定量测定同前报^[6]。

结 果 与 讨 论

(一) 影响 2-DGA 产量的因素

1. 不同碳源对产酸的影响：基础培养基组分(%)：尿素 0.1, CaCO₃ 0.2, 玉米浆 0.3, KH₂PO₄ 0.05, K₂HPO₄ 0.05, MgSO₄ · 7H₂O 0.02, 不同碳源的用量均为 2.0, pH 7.0, 8 磅 30 分灭菌。于 28—30℃ 振荡培养 48 小时后, 用纸层析定性, 结果见表 1。

从表 1 可见 E54 菌株能利用葡萄糖, 葡萄糖酸钙和半乳糖产酸。葡萄糖作为碳源最为有利。

2. 不同氮源对产酸的影响：以发酵培养基 (扣除玉米浆和尿素) 为基础培养基, 加入不同氮源, 28—30℃ 发酵 72 小时, 测定结果如表 2。

表 2 说明, 所试六种氮源均能作为产生 2-DGA 的氮源, 以尿素较好。

3. 不同接种量对产酸的影响：以相同种龄的种子液按不同接种量 (5、8、10、12、14%) 接入发酵培养基中, 28—30℃ 振荡培养 72 小时, 结果表明 (表 3) 接种量以 5—8% 较好。

4. 通气量对产酸的影响：于 250ml 三角瓶中装入不同体积的发酵培养基, 接种量为 7%, 28—30℃ 振荡培养 72 小时, 结果见表 4。

表 4 说明, 250ml 三角瓶装量 20—25ml 为宜。通气量不足严重影响产酸。

5. 不同温度对产酸的影响：接种量为 7%, 发酵培养基装量为 25 ml/250 ml 三角瓶, 置于

表 1 不同碳源对产酸的影响

项 目 结 果 碳 源	发 酵 最 终 pH	2-DGA	项 目 结 果 碳 源	发 酵 最 终 pH	2-DGA
葡萄糖	5.0	++	半乳糖	7.0	+
山梨糖	7.0	—	甘露糖	6.5	—
葡萄糖酸钙	6.5	+	麦芽糖	6.5	—
蔗糖	7.0	—	甜菜糖蜜	6.5	—
果糖	6.5	—	甘蔗糖蜜	6.5	—
乳糖	6.5	—	葡萄糖液	6.5	—

注：+：利用产酸 —：不利用

表 2 不同氮源对产酸的影响

项 目 结 果 氮 源(%)	发 酵 最 终 pH	2-DGA (mg/ml)	平均转化率 (%)
玉米浆 1.0	5.5	111.5	71.01
蛋白胨 0.3	5.5	114.4	72.85
酵母膏 0.3	5.5	129.4	82.41
硫酸铵 0.1	5.5	136.5	86.93
尿 素 0.1	6.0	138.5	88.20
硝酸钾 0.1	5.5	113.4	72.22

表 3 不同接种量对产酸的影响

项 目 结 果 接种量(%)	发 酵 最 终 pH	2-DGA (mg/ml)	平均转化率 (%)
5	5.0	100.4	63.94
8	6.0	95.15	60.6
10	6.0	79.0	50.31
12	6.0	86.0	54.77
14	6.0	86.0	54.77

表 4 不同通气量对产酸的影响

项 目 结 果 装量(ml/250ml)	发 酵 最 终 pH	2-DGA (mg/ml)	平均转化率 (%)
15	5.5	104.4	66.49
20	6.0	116.5	74.19
25	6.0	117.5	74.83
40	5.0	95.2	60.63
60	5.5	33.5	21.33
75	5.0	41.4	26.37

表 5 不同温度对产酸的影响

项 目 结 果 温 度(°C)	发 酵 最 终 pH	2-DGA (mg/ml)	平均转化率 (%)
22—25	6.5	70.7	45.02
28—30	6.0	127.5	81.20
37	6.0	109.4	69.67
42	5.5	0	

不同温度下振荡培养 72 小时,结果表明(表 5), 明显影响。

最适发酵温度为 28—30℃。

6. 金属离子对产酸的影响: 在发酵培养基中加入不同种和量的金属离子,于 28—30℃ 振荡培养 72 小时,结果表明(表 6),加入 Fe^{+++} (5—30ppm) 和 Cu^{++} (1—10ppm) 对产酸无

(二) 种子培养基和发酵培养基的正交试验

1. 种子培养基正交试验: 为了寻求较适合的种子培养基配比,选用 $L_9(3^4)$ 正交表,进行了多因素、多水平的种子培养基试验。即

表6 金属离子对产酸的影响

项目 处 理 结 果		发 酵 最 终 pH	2-DGA (mg/ml)	平均转化率 (%)
Fe ⁺⁺⁺	5ppm	5.5	103.4	65.85
	10ppm	5.4	113.1	72.03
	30ppm	5.4	120.4	76.68
Cu ⁺⁺	1ppm	5.5	118.4	75.4
	5ppm	5.5	116.5	74.19
	10ppm	5.5	110.6	70.43
对 照		5.5	108.5	69.1

表7 种子培养基正交试验结果

列 号 试 验 号	MgSO ₄ · 7H ₂ O (%)	酵 母 膏 (%)	蛋 白 胨 (%)	玉 米 浆 (%)	2-DGA (mg/ml)	转 化 率 (%)
1	0.2	0.1	0.1	0.0	1.5	15.28
2	0.2	0.5	0.0	0.1	4.6	46.87
3	0.2	1.0	0.3	0.3	0.5	5.09
4	0.1	0.1	0.0	0.3	1.0	10.2
5	0.1	0.5	0.3	0.0	5.2	53.0
6	0.1	1.0	0.1	0.1	2.0	20.38
7	0.05	0.1	0.3	0.1	0.5	5.09
8	0.05	0.5	0.1	0.3	3.1	31.59
9	0.05	1.0	0.0	0.0	4.1	41.78

表8 发酵培养基正交试验结果

列 号 试 验 号	葡 萄 糖 (%)	MgSO ₄ · 7H ₂ O (%)	K ₂ HPO ₄ (%)	KH ₂ PO ₄ (%)	2-DGA (mg/ml)	转 化 率 (%)
1	16.0	0.01	0.10	0.03	147.6	94.0
2	16.0	0.02	0.07	0.0	136.5	86.93
3	16.0	0.03	0.05	0.05	137.5	87.57
4	18.0	0.01	0.07	0.05	159.9	90.05
5	18.0	0.02	0.05	0.03	139.5	78.97
6	18.0	0.03	0.10	0.0	137.5	77.84
7	20.0	0.01	0.05	0.0	147.6	75.2
8	20.0	0.02	0.10	0.05	147.6	75.2
9	20.0	0.03	0.07	0.03	152.6	77.75

MgSO₄ · 7H₂O(%): 0.2, 0.1, 0.05; 蛋白胨(%): 0.1, 0.0, 0.3; 酵母膏(%): 0.1, 0.5, 1.0; 玉米浆(%): 0.0, 0.1, 0.3。试验结果见表7。

试验结果表明, 产酮产碱菌以第五号种子培养基配比组合较好(葡萄糖 1.0%, MgSO₄ · 7H₂O 0.1% 蛋白胨 0.5%, 酵母膏 0.3%), 发酵液中 2-酮基-D-葡萄糖酸对葡萄糖的转化率最

高。

2. 发酵培养基正交试验: 在确定了种子培养基的基础上, 发酵培养基正交试验经过两次, 第一次确定下列因素的最适配比: 玉米浆 1.0% 尿素 0.1%, CaCO₃ 4.5%。第二次正交试验仍选用 L₉(3⁴) 正交表进行, 因素和水平为: 葡萄糖(%): 16.0, 18.0, 20.0; MgSO₄ · 7H₂O(%):

0.01, 0.02, 0.03; K_2HPO_4 (%); 0.1, 0.07, 0.05; KH_2PO_4 (%): 0.03, 0.0, 0.05。试验结果见表 8。

试验结果表明, 以第一号发酵培养基配比组合较好 (葡萄糖 16.0%, 玉米浆 1.0%, 尿素 0.1% $CaCO_3$ 4.5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01%, K_2HPO_4 0.1%, KH_2PO_4 0.03%)。

(三) 2-酮基-D-葡萄糖酸发酵代谢图谱

为了解产酮产碱菌新种的发酵全过程, 定期测定葡萄糖的消耗, 2-酮基-D-葡萄糖酸的产生, 发酵液的旋光值和 pH 值。测定结果如图 1 所示。产酮产碱菌在发酵过程中随着葡萄糖逐渐消耗, 发酵液中旋光值由正值转向负值, 2-DGA 逐渐积累。葡萄糖消耗殆尽, 2-DGA 量达到高峰。发酵前期 pH 值明显下降, 14 小时左右以后不再下降, 并稳定到发酵终点。

产酮产碱菌 E54 是一株过去文献中未曾报道过的新种, 以葡萄糖为基质产生大量的 2-DGA。该菌易于培养, 产酸性能稳定, 其最高转化率可达 90—94%, 和国内研究单位报道的其它菌转化率相当, 该菌是一株可推广应用的新的优良菌种。

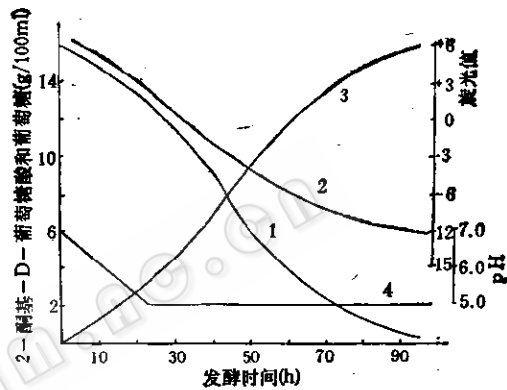


图 1 产酮产碱菌产酸发酵代谢图

1. 葡萄糖 2. 旋光值 3. 2-酮基-D-葡萄糖酸 4. pH 值

参 考 文 献

- [1] Bernbauer, K. and B. Gorch: *Biochem. Z.*, **280**: 367, 1935.
- [2] Nunheumer, Th. D. and T. Philips: *U. S. Patent*, 3, 255, 093, 1964.
- [3] Misenheimer, T. J. et al.: *Appl. Microbiol.*, **13**: 395, 1965.
- [4] 蒋明珠等: *生物研究通报* **2**(3): 35—41, 1984.
- [5] 尹光琳等: *微生物学报* 待发表。
- [6] 梁改芹等: *微生物学通报*, **14**(6): 246—248.