

# 2-酮基-D-葡萄糖酸产生菌种子培养基的优选

蒋明珠 白照熙 谢红 张俊贤 孙文敬 许孟琴 吴芷萍

(山西省生物研究所,太原)

**摘要** 本文报道 2-酮基-D-葡萄糖酸产生菌种子培养基优选的结果。用生产菌株荧光假单胞菌 K1005和球状节杆菌 K1022 进行试验,其较好的种子培养基为:葡萄糖2%,玉米浆1.0%,尿素0.2%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1—0.2%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%, pH7.0。廉价的玉米浆和尿素可以替代昂贵的牛肉膏、蛋白胨和酵母膏。所优选的种子培养基的原材料成本大幅度下降。

**关键词** 2-酮基-D-葡萄糖酸;发酵;荧光假单胞菌;球状节杆菌

2-酮基-D-葡萄糖酸是生产食品添加剂D-异抗坏血酸及其钠盐的前体。2-酮基-D-葡萄糖酸发酵过程中,液体种子的好坏直接影响生产菌株对糖的转化率。而种液的好坏除菌株本身外,与所使用的种子培养基的组成关系很大。培养 2-酮基-D-葡萄糖酸产生菌,国内外常采用酵母膏、蛋白胨、牛肉膏和脱脂奶粉等作为氮源<sup>[1-3]</sup>。这些原料价格昂贵,影响产品原材料成本的降低。因而,优选一种廉价的适合于生产菌株生长繁殖且具有高活性的种子培养基十分必要。本文报道改进种子培养基成分和配比的研究结果。

## 材料和方法

1. 菌种: 荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) K1005<sup>[4]</sup> 和球状节杆菌 (*Arthrobacter globiformis*) K1022<sup>[5]</sup>, 均由山西省生物研究所筛选得到。

2. 斜面培养基和培养方法: 斜面培养基(g): 牛肉膏 3, 蛋白胨 10, NaCl 5, 琼脂 20, 自来水 1000ml, pH6.7。将保藏菌种移接于斜面上, 30℃培养 24 小时。

3. 种子培养基和培养方法: 原种子培养基(g): 葡萄糖 10, 酵母膏 3, 蛋白胨 10, 牛肉膏 3,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  3, 自来水 1000ml, pH 6.7。取一环已活化的菌苔, 接入种子培养基(250ml 三

角瓶装量 25ml)中, 30℃ 振荡培养 24 小时, 以 8% 接种量接入发酵培养基中。

4. 发酵培养基及培养方法: 发酵培养基(g): 葡萄糖 200, 酵母膏 3,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5,  $\text{CaCO}_3$  50, 自来水 1000ml, pH 6.7。培养时间 72 小时左右, 装量及培养条件同液体种子。

## 5. 分析方法

(1) 用国产精密 pH 试纸测定 pH。

(2) 液体种子吸光度测定: 将种液用蒸馏水稀释 20 倍, 采用国产 721 型分光光度计测定吸光度  $A_{670\text{nm}}$  值。

(3) 2-酮基-D-葡萄糖酸测定: 采用旋光法<sup>[6]</sup>。

## 结果

### (一) 种子培养基氮源试验

原种子培养基氮源由昂贵的酵母膏、蛋白胨和牛肉膏组成, 为选取廉价的氮源, 我们进行了多种氮源试验, 结果见表 1。

由表 1 可见, 有机氮一般优于无机氮, 有机氮源中以玉米浆和酵母膏较好, 无机氮源中以  $\text{NaNO}_3$  和尿素较好。

### (二) 种子培养基正交试验

在种子培养基氮源试验的基础上, 我们选取了廉价的玉米浆、尿素, 结合碳源和无机盐采

表 1 2-酮基-D-葡萄糖酸产生菌种子培养基氮源试验\*

氮源	用量 (%)	pH	A <sub>690nm</sub>	氮源	用量 (%)	pH	A <sub>690nm</sub>
牛肉膏	0.3	7.2	0.82	尿素	0.3	9.0	0.19
蛋白胨	0.3	7.2	0.34	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.3	6.4	0.05
酵母膏	0.3	7.5	1.03	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.3	6.7	0.07
聚脲	0.3	7.2	0.37	NaNO <sub>3</sub>	0.3	7.0	0.34
玉米浆	0.3	7.5	1.28	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.3	6.7	0.14

\* 种子培养基基础成份: 葡萄糖 1%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%, pH7.0。试验菌种 K1005, 30℃ 培养 24 小时, 测 A<sub>690nm</sub> 时未稀释

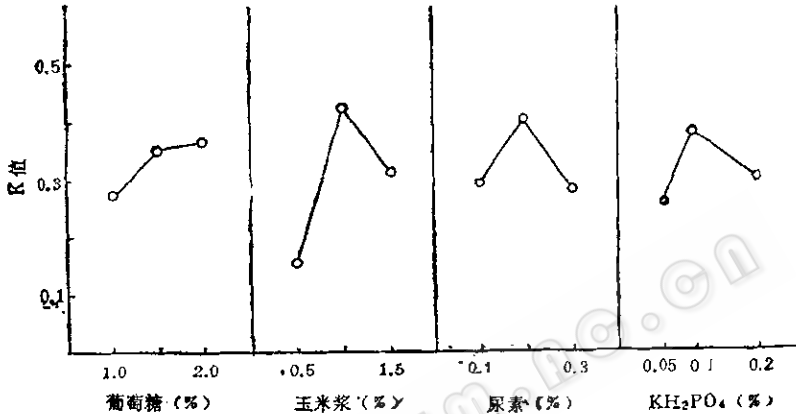


图 1 不同浓度葡萄糖、玉米浆、尿素和 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 按正交试验 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 综合考察对种液吸光度 (A<sub>690nm</sub>) 的影响 (所试菌种为荧光假单胞菌 K1005, 各种种子培养基中均加入 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%, pH7.0, 30℃ 培养 24 小时, 测定 A<sub>690nm</sub> 值)

用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表, 进行了多因素、多水平的种子培养基正交试验。正交试验结果见图 1。

图 1 表明, 在所试各因素水平范围内, 玉米浆浓度对种液吸光度影响最大, 其次是尿素和 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 葡萄糖浓度影响较小。

根据正交试验结果与分析, 最好种子培养基的组成为 (%): 葡萄糖 2.0, 玉米浆 1.0, 尿素 0.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05。最佳种子培养基组成为 (%): 葡萄糖 2.0, 玉米浆 1.0, 尿素 0.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05。

从最好和最佳种子培养基的成份比较, 除 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 稍有差异外, 其它成份完全一致。

为了进一步证明种子的活力, 将原种子培养基、最好种子培养基和最佳种子培养基培养的种液, 接入发酵培养基中进行发酵, 测发酵液中 2-酮基-D-葡萄糖酸的含量, 比较对 2-酮基-D-葡萄糖酸产生菌活力的影响, 结果见表 2。

由表 2 可见, 改进种子培养基(最好和最佳种子培养基) 种液 A<sub>690nm</sub> 高于原种子培养基,

表 2 新老种子培养基对 2-酮基-D-葡萄糖酸产量的影响\*

种子培养基	种液 pH	种液 A <sub>690nm</sub>	发酵液中 2-酮基-D-葡萄糖酸 (g/100ml)	克分子转化率 (%)
原种培养基	8.0	0.38	17.6	89.8
最好种子培养基	8.5	0.49	17.3	88.3
最佳种子培养基	8.0	0.51	18.3	93.4

\* 所试菌种为荧光假单胞菌 K1005

发酵液中 2-酮基-D-葡萄糖酸的含量及对糖的克分子转化率均不相上下,说明用改进种子培养基培养的 2-酮基-D-葡萄糖酸产生菌活力是高的。

### (三) 改进种子培养基用于培养球状节杆菌 K1022

目前,我们在生产中推广应用的 2-酮基-D-葡萄糖酸产生菌主要有两株—荧光假单胞菌 K1005 和球状节杆菌 K1022。从以上试验结果不难看出改进种子培养基适用于 K1005。是否也适用于其它 2-酮基-D-葡萄糖酸产生菌,我们采用 K1022 进行了发酵试验。

试验中采用的种子培养基为最好种子培养基。种液  $A_{690nm}$  为 0.49, pH8.5, 与 K1005 种液吸光度和 pH 值接近。发酵试验结果表明,发酵液中 2-酮基-D-葡萄糖酸达 18.3g/100ml, 克分子转化率达 93.4%。上述结果说明用荧光假单胞菌 K1005 优选的种子培养基亦适用于球状节杆菌 K1022。

## 讨 论

通过 2-酮基-D-葡萄糖酸产生菌种子培养基的优选,较好的种子培养基为:葡萄糖 2.0%, 玉米浆 1.0%, 尿素 0.2%,  $KH_2PO_4$  0.1—0.2%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05%, pH7.0。廉价的玉米浆

和尿素可以代替昂贵的牛肉膏、蛋白胨和酵母膏。该种子培养基既适合荧光假单胞菌 K1005, 亦适合于球状节杆菌 K1022。采用改进种子培养基培养 2-酮基-D-葡萄糖酸生产菌株 K1005 和 K1022, 菌株生长正常、其种液 pH 与原种子培养基基本相同;  $A_{690nm}$  高于原种子培养基,说明改进种子培养基更适合于菌株的生长。改进种子培养基的种液接入发酵培养基后,产酸转化率可达 90% 左右,与原种子培养基不相上下,说明改进种子培养基对菌株产酸无明显影响。

南京制药厂把上述优选的种子培养基用于 2-酮基-D-葡萄糖酸生产菌株 K1005 和 K1022, 种液 pH7—8,  $A_{690nm}$  0.40—0.60, 发酵正常。500 升种子罐采用原种子培养基的原材料成本 150 元左右,而改进种子培养基的原材料成本仅 30 元左右。在生产上使用改进种子培养基后,取得了比较显著的经济效益。

## 参 考 文 献

- [1] Jaffe, G. M. et al.: U. S. Patent, 3, 381, 027, 1968.
- [2] Misenheimer, T. J. et al.: Appl. Microbiol., 15 (3): 393—396, 1965.
- [3] 曹桂芳等: 微生物学通报, 15(1): 7—11, 1988.
- [4] 蒋明珠等: 微生物学通报, 10(3): 103—106, 1983.
- [5] 白照熙等: 食品与发酵工业, 3: 46—49, 1984.