

食品抗氧化剂-D-异抗坏血酸的研究

I. 2-酮基-D-葡萄糖酸产生菌的筛选和产物的鉴定

梁改芹 曹桂芳 尹光琳*

(中国科学院微生物研究所, 北京)

摘要 从199株细菌中筛选出产2-酮基-D-葡萄糖酸的高产菌株2株。产物对葡萄糖的克分子转化率达85.93%、87.56%以上。经生物学鉴定, 菌株E301为恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*), 菌株E54为产碱菌属的一个新种, 为产酮产碱菌(*Alcaligenes ketogenes* nov. sp.)。将发酵产物及其转化成的D-异抗坏血酸钠样品经红外吸收光谱比较, 结果均与标准品相同。可确定这两株菌的发酵产物确系2-酮基-D-葡萄糖酸钙。

关键词 产酮产碱菌; 恶臭假单胞杆菌; 2-酮基-D-葡萄糖酸; D-异抗坏血酸。

D-异抗坏血酸(异维生素C), 又名赤藻糖酸, 是维生素C的旋光异构体, 在食品工业上被广泛用作抗氧化剂。国外一些国家已正式列为食品添加剂。从1940年以来, 国外对D-异抗坏血酸前体-2-酮基-D-葡萄糖酸的产生及发酵

进行了广泛的研究, 其中醋酸杆菌属(*Acetoba-*

本工作承陈瑞、黄和容先生提出宝贵意见, 刘庆臣同志参加部分工作, 红外光谱请叶绪慰同志代测, 特此一并致谢。

* 现在工作单位: 上海交通大学生物科技系

cter)^[1]、葡萄糖酸杆菌属 (*Gluconobacter*)^[2]、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)^[3]、沙雷氏菌属 (*Serratia*)^[4] 和欧文氏菌属 (*Erwinia*)^[5] 等菌株均能产生 2-酮基-D-葡萄糖酸。近年来国内不少单位相继进行了有关研究^[6]。本文报道 2-酮基-D-葡萄糖酸高产菌株的筛选和产物的鉴定。

材料和方法

(一) 产酸菌株的来源

从土壤中分离到利用葡萄糖的细菌 97 株,从微生物所菌种保藏室取来细菌 102 株,共 199 株。

1 培养基: ①分离培养基成分(%): 蛋白胨 1, 牛肉膏 0.3, NaCl 0.5, 琼脂 2.2, 用自来水配制, 加入少量指示剂, pH 7.0, 1kg/cm² 高压蒸汽灭菌 30 分钟。②筛选培养基成分(%): 葡萄糖 1, 酵母膏 0.3, 蛋白胨 0.1, NaCl 0.1, 用自来水配制, pH 7.0, 0.55kg/cm² 灭菌 30 分钟。

2 筛选方法: 菌株经活化后, 取一环菌苔接入葡萄糖培养基内, 在 28℃ 培养 48 小时后, 用纸层析法定性^[7], 进行初筛。再将初筛选出产酸菌株用 5—10% 的葡萄糖培养基进行复筛。

(二) 分析方法

1. pH 值测定: 用国产精密 pH 试纸测定。

2. 2-酮基-D-葡萄糖酸定性用 Whatman I 层析滤纸测定。展开剂①吡啶-乙酸乙酯-乙酸-水 (5:5:1:3V/V)。②正丁醇-乙酸-水 (4:1:1V/V)。均为上行展开, 温度 30—35℃, 时间约 4—6 小时。显色剂① 0.05% 溴酚蓝水溶液喷雾显色, 以标准品为对照, 在淡蓝色的背景上显黄色斑点。② 4% TTC 碱性溶液喷雾显色, 在淡红色的背景上显红色斑点。

3. 定量测定: ①参照 Stubbs^[8] 等人用旋光法测定产酸量。②转化碘量法: 用硫酸将 2-酮基-D-葡萄糖酸转化成异维生素 C, 再用碘滴定。

结果与讨论

(一) 产 2-酮基-D-葡萄糖酸菌株的筛选

从 199 株细菌中, 通过初筛和复筛有 10 株菌产生 2-酮基-D-葡萄糖酸, 其中 E301 和 E54 菌株对葡萄糖的克分子转化率达 85.93%、87.56%。从纸层析结果来看, 发酵产物单一, 两株菌均可作为 2-酮基-D-葡萄糖酸的生产菌株。

(二) 菌种的鉴定

菌株 E301 (图 1) 为革兰氏阴性短杆菌, 产生水溶性萤光色素, 端生单根鞭毛运动。氧化酶阳性, 氧化葡萄糖产酸。精氨酸双水解酶阳性, 但不产生聚-β-羟基-丁酸盐 (PHB 颗粒), 能利用多种碳源。最适温度 28℃, 41℃ 不生长。硝酸还原阳性。石蕊牛乳产碱, 不液化明胶。根据上述主要形态特征和生理生化特征, 按 Bergey's 手册第八版^[9] 定名为恶臭假单胞杆菌 (*Pseudomonas putida*)。

菌株 E54 (图 2) 为革兰氏阴性短杆菌, 根据鉴定结果定名为产碱菌属的一个新种, 为产酮产碱菌 (*Alcaligenes ketogenes* Yin & Cai) 另

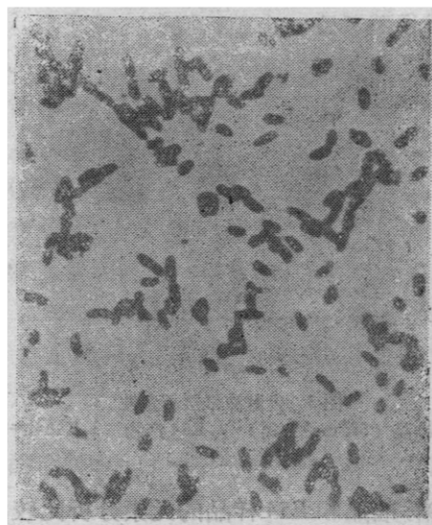


图 1 恶臭假单胞杆菌 E301 (×1000)

有专文报道^[10]。

(三) 发酵液中 2-酮基-D-葡萄糖酸钙的

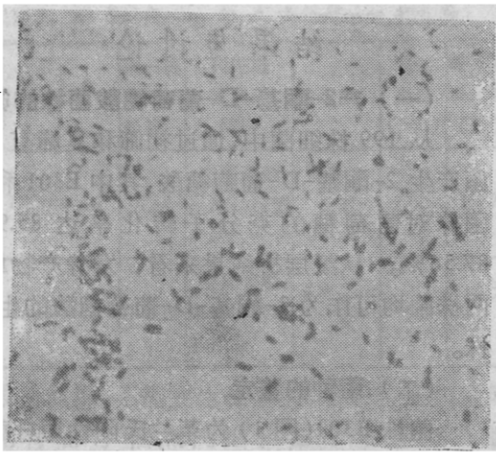


图2 产酮产酸菌 E54($\times 1000$)

提取及其产物鉴定

1. 发酵液中加入 0.3% 活性炭, 80℃ 加热 15 分钟, 4000r/min 离心 20 分钟取上清液, 减压浓缩得白色结晶。

2. 2-酮基-D-葡萄糖酸钙的鉴别

③纸层析定性表明, E301、E54 菌株的发酵液分离和显示斑点的 Rf 值与标准品(Sigma 公司生产)相同(图 3)。

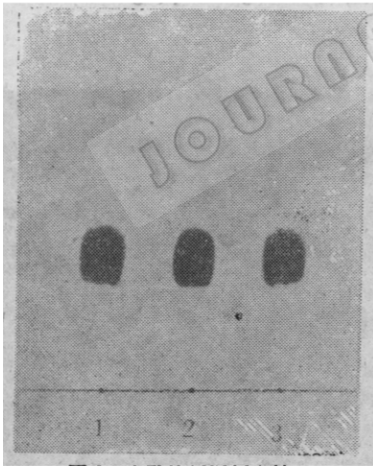


图3 发酵液纸层析定性

1. 标准品 (Sigma 公司) 2. E54 产物 3. E304 产物

②标准品和 E54 样品的元素分析比较, 如表 1 所列, 根据测定结果和标准品相一致。

③菌 E301 和 E54 提取结晶与标准品的红外吸收光谱图相一致(图 4)。

为了进一步鉴别, 分别用 E301、E54 菌株的

表1 E54 菌株发酵样品的元素分析

元 素	计算值 (%)	测定值(%)			
		标准品		样 品	
C	30.03	29.57	29.56	29.64	29.81
H	3.90	5.19	5.11	4.83	5.00

发酵液所提取的 2-酮基-D-葡萄糖酸钙的结晶再经化学转化生成的 D-异抗坏血酸钠与标准的 D-异抗坏血酸钠 (Sigma 公司生产) 进行红外吸收光谱比较, 结果与标准品相一致(图 5)。

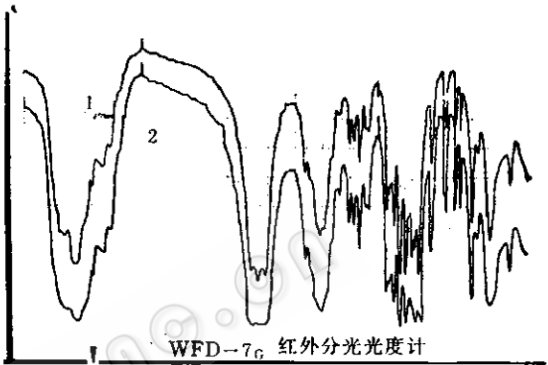


图4 α -酮基-D-葡萄糖酸钙红外吸收光谱
1. 标准品 2. E54 发酵产物

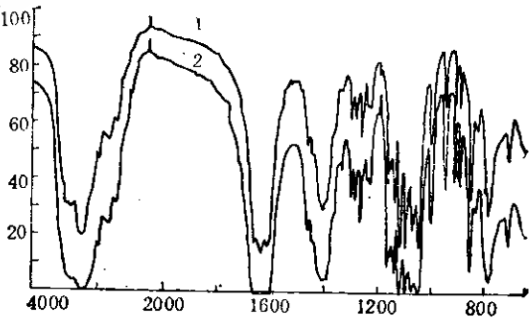


图5 D-异抗坏血酸钠红外吸收光谱
1. 标准品 2. E54 发酵产品转化的 D-异抗坏血酸

根据上述结果可以认为 E301、E54 菌株以葡萄糖为基质, 经发酵提取的结晶确系 2-酮基-D-葡萄糖酸钙。

参 考 文 献

[1] Kulka, D. and T. K. Walkew.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 50: 169, 1954.
[2] Asai, T. and Y. Ikeda.: *J. Agr. Chem. Soc. Japan.*, 22: 50, 1948.
[3] Nunheimer, Th. D. and T. Phillips.: U. S. Patent,

3,255,039, 1964.

[4] Miserheimer, T. T. et al.: *Appl. Microbiol.*, 13: 395, 1965.

[5] Suzuki, Y. and K. Vchida.: *Agr. Biol. Chem.*, 29: 456, 1965.

[6] 白照熙、蒋明珠: 生物研究通报, 2(3): 31—34, 1984.

[7] Okazaki, H. et al.: *Agri. Chem.*, 32: 10, 1250—

1255, 1968.

[8] Stubbs, J. J. et al.: *Ind. Eng. Chem.*, 32: 1626—1631, 1940.

[9] Buchanan, R. E. and N. Gibbons.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Eighth Edition). P 217—243, 274—275, 1974.

[10] 严光琳等: 微生物学报, 待发表。