

抗噬菌体菌株荧光假单胞菌 A46 在 D-异抗坏血酸钠工业生产中的应用研究

孙文敬¹ 赵峰梅¹ 黄惠英² 杨庆文¹ 郭金权¹ 蒋明珠¹

1(山西省生物研究所,太原,030006)

2(郑州市生物化工厂,郑州,450007)

摘 要 荧光假单胞菌 A46 是通过紫外线诱变 K1005 菌株所得到的一株抗噬菌体菌株。在噬菌体存在的情况下,使用菌株 A46 和 K1005 在 50 kL 的发酵罐上进行了 2-酮基-D-葡萄糖酸的发酵生产。结果表明,荧光假单胞菌 A46 对噬菌体的抗性稳定,其发酵周期短,发酵转化率高;经过多次传代,荧光假单胞菌 A46 对噬菌体的抗性及其发酵生产 2-酮基-D-葡萄糖酸的能力没有改变;该菌株的发酵产物可以用于 D-异抗坏血酸钠的合成中。

关键词 2-酮基-D-葡萄糖酸 荧光假单胞菌 噬菌体 抗噬菌体菌株 D-异抗坏血酸钠

D-异抗坏血酸钠是一种在国内外得到普遍使用的食品抗氧化剂,其生产一般采用间接发酵法,即以细菌发酵 D-葡萄糖为 2-酮基-D-葡萄糖酸(以下简称 2KG),再经酯化、转化及精制等步骤而制得成品^[1]。

在 D-异抗坏血酸钠生产中,国内采用的 2KG 产生菌通常为荧光假单胞菌 K1005,其发酵周期短,产酸率高^[2]。但在近年来的春、秋季生产中,该菌株经常遭到噬菌体的侵染,发酵周期大大延长,发酵转化率明显降低,生产厂家蒙受了很大的经济损失。因此,我们对荧光假单胞菌 K1005 的 2KG 发酵中的噬菌体污染情况进行了调查,并从其异常发酵液中分离纯化了噬菌体 KS502 和 KS503。在此基础上,以荧光假单胞菌 K1005 为出发菌株,采用紫外线诱变的方法,选育了抗噬菌体菌株 A46 和 C65^[3]。经多次摇瓶发酵试验验证,荧光假单胞菌 A46 和 C65 对噬菌体 KS502 和 KS503 抗性稳定,产酸水平与 K1005 菌株相当,对糖的发酵转化率可达 90% 左右,有望应用于生产。本文报道荧光假单胞菌 A46 在 D-异抗坏血酸钠工业生产中应用的研究结果。

1 材料与方法

1.1 菌种

荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) A46 及其亲株 K1005,由山西省生物研究所工业微生物研究室选育保藏。

1.2 发酵设备

600 L 的一级种子罐、7 kL 的二级种子罐和 50 kL 的发酵罐,均为标准罐型,罐体材质为碳钢。

1.3 培养基

斜面培养基:牛肉膏 0.3%,蛋白胨 1.0%,NaCl 0.5%,琼脂 2.0%,pH 6.7~7.0。

种子培养基:葡萄糖 2.0%,玉米浆 1.0%,尿素 0.2%,KH₂PO₄ 0.2%,MgSO₄·7H₂O 0.05%,CaCO₃ 0.5%,pH 7.0。

发酵培养基:玉米淀粉水解糖(以还原糖计) 14.75%,玉米浆 1.65%,尿素 0.006%,KH₂PO₄ 0.003%,CaCO₃ 4.0%,pH 6.7~7.0。

1.4 培养方法

茄子瓶菌种培养:保藏菌种经 2 次活化

第一作者:学士,副研究员。

收稿时间:2000-12-21

后接入茄子瓶斜面,30℃培养 2 d。

1 级种子罐菌种培养:将 2 个茄子瓶斜面菌种的菌悬液接入 350 L 种子培养基中,控制罐温 31℃、罐压 0.07 MPa、通气比 1:0.5 VVM 培养 10 h 左右。

2 级种子罐菌种培养:以 10% 的接种量将一级种子移入 3.5 kL 种子培养基中,控制罐温 31℃、罐压 0.05 MPa、通气比 1:0.5 VVM 培养 6 h 左右。

发酵:将培养好的 2 级种子移入 35 kL 发酵培养基中,控制罐温 32℃、罐压 0.03 MPa、通气比 1:0.8 VVM 进行发酵。

1.5 噬菌体检查及菌株抗性确证

采用双层琼脂平板法。

1.6 D-异抗坏血酸钠的合成方法

采用 H₂SO₄ 酸化的方法净化发酵液,再经酯化、转化及精制等步骤而制得成品^[1]。

1.7 测定方法

菌体生长量(OD 值)的测定:用 0.05 mol/L 的 HCl 稀释种液或发酵液 20 倍,以新制蒸馏水作空白,用 721 型分光光度计测定 690 nm 处的光密度,比色杯的光程为 1 cm。

pH 值测定:使用国产 PHS-25A 型 pH 计测定。

2KG 含量的测定:旋光法。

D-异抗坏血酸钠质量检测:按中华人民共和国国家标准 GB 8273—1987 检测。

2 结果与讨论

2.1 菌株 A46 与 K1005 的种子培养液质量比较

根据以前的研究结果^[4]和生产经验,在镜检的基础上,考察 2KG 产生菌种子培养液质量的主要指标为 pH 值、菌体生长量即 OD₆₉₀ 值和培养周期。在生产环境中噬菌体大量存在的情况下,使用菌株 A46 和 K1005 各进行了连续 10 批次的罐上种子培养。结果(表 1)表明,A46 和 K1005 的种液在 pH 值、OD₆₉₀ 值及培养周期上无明显差别。此外,在种子培养过程中,A46 和 K1005 均未

出现溶菌现象,且菌体生长形态正常。

表 1 A46 与 K1005 的种子培养液质量比较

菌株	批号	1 级种液			2 级种液		
		pH	OD ₆₉₀	周期/h	pH	OD ₆₉₀	周期/h
K1005	1	5.8	0.180	11.7	7.0	0.480	7.0
	2	5.8	0.180	8.0	6.3	0.470	6.7
	3	5.8	0.270	10.0	7.0	0.470	5.3
	4	5.8	0.180	8.8	7.0	0.490	6.0
	5	5.8	0.200	9.5	7.0	0.490	6.3
	6	5.8	0.190	10.0	7.1	0.480	5.7
	7	5.8	0.200	8.5	7.0	0.470	5.5
	8	5.8	0.170	9.5	6.8	0.470	6.0
	9	5.8	0.200	9.0	7.0	0.500	6.0
	10	5.8	0.200	10.0	7.0	0.460	5.4
A46	1	5.8	0.190	10.0	7.1	0.470	6.8
	2	5.8	0.180	8.5	7.0	0.490	6.0
	3	5.8	0.180	9.0	7.0	0.470	6.4
	4	5.8	0.190	9.0	7.1	0.470	7.0
	5	5.8	0.185	9.8	7.1	0.480	6.2
	6	5.8	0.190	9.8	7.1	0.470	6.0
	7	5.8	0.180	9.0	7.1	0.480	6.3
	8	5.8	0.190	8.5	7.2	0.480	6.0
	9	5.8	0.190	9.0	7.0	0.480	6.5
	10	5.8	0.180	10.0	7.1	0.460	6.0

2.2 菌株 A46 与 K1005 的发酵过程及其 2KG 生产能力的比较

利用上述的 A46 和 K1005 二级种子培养液,在 50 kL 发酵罐上各进行了连续 10 批次的发酵试验。从发酵过程来看,在 pH 值、OD₆₉₀ 值、耗糖及产 2KG 变化上,采用菌株 A46 进行的发酵均与 K1005 的正常发酵基本相同,只是发酵中、后期 A46 的 OD₆₉₀ 值比 K1005 一般要高 10% 以上;在使用 K1005 菌株进行的 10 批次发酵中,有 6 批次出现异常,其耗糖及产 2KG 的速度均十分缓慢,OD₆₉₀ 值波动十分明显,经双层琼脂平板检查证实,这 6 批发酵受到了噬菌体污染。从 2KG 生产能力(见表 2)来看,菌株 A46 与未受噬菌体侵染的 K1005 基本相同,而受到噬菌体侵染的 K1005 菌株的 2KG 产量及发酵转化率明显降低(第 7 批例外),发酵周期大大延长。另外,对 6 批次 K1005 异常发酵液中的噬菌体进行了分离纯化,其噬菌斑有 2 种形态,分别与已报道的噬菌体 KS502 和

KSS03的噬菌斑^[3]相同。经检测证实,6批次K1005异常发酵液中的噬菌体均不能侵染A46菌株。

表2 A46与K1005的2KG生产能力比较

菌株	批号	2KG产量	发酵转化率	发酵周期
		/kg	%	/h
K1005	1	4685.82	84.22	28.5
	2	4935.27	88.70	28.0
	3	4903.64	88.13	27.0
	4	4776.55	85.85	29.0
	5*	3487.55	62.68	120.5
	6*	4524.09	81.31	37.0
	7*	4901.00	88.08	72.5
	8*	3970.27	71.36	99.5
	9*	4370.23	78.54	57.5
	10*	4187.73	75.26	103.7
A46	1	4961.45	89.17	27.5
	2	4815.32	86.54	33.0
	3	4708.91	84.63	29.0
	4	4888.00	87.85	31.0
	5	4982.73	89.55	30.5
	6	4849.59	87.16	35.5
	7	4846.50	87.10	29.0
	8	4900.00	88.07	30.0
	9	4914.00	88.32	29.0
	10	4809.73	86.44	29.0

注:表示噬菌体污染。

2.3 抗噬菌体菌株A46的遗传稳定性

在生产环境中噬菌体大量存在的情况下,采用不同代次的抗株A46各进行了1批次发酵生产试验,观察其遗传稳定性。试验结果(表3)表明,经多次传代,抗株A46的2KG生产能力几乎没有改变,且发酵过程中无异常现象发生,即菌株的抗性没有改变。

表3 不同代次A46菌株的2KG生产能力

菌株代次	2KG产量	发酵转化率	发酵周期
	/kg	%	/h
5	4845.27	87.08	32.2
6	4827.09	86.76	29.0
7	4785.45	86.01	28.0
8	4815.32	86.54	28.5
9	4830.55	86.82	36.0
10	4956.36	89.08	29.0
11	4914.00	88.32	30.0
12	4879.64	87.70	34.5
13	4995.91	89.79	36.0
14	4862.45	87.39	30.3
15	4759.36	85.54	34.0
16	4825.00	86.72	34.5
17	4717.64	84.79	31.5

2.4 利用菌株A46与K1005的发酵产物生产D-异抗坏血酸钠的各步收率及成品质量比较

在进行发酵过程及2KG生产能力的比较中,使用菌株A46的10罐批生产了2KG 48676.23 kg,使用菌株K1005的10罐批生产了2KG 44742.15 kg。将上述的2KG用于D-异抗坏血酸钠生产中,分别得到了36051.04 kg和32761.48 kg的成品。从各步收率(表4)来看,利用菌株A46与K1005的发酵产物生产D-异抗坏血酸钠无明显差别;从产品质量的检测结果来看,利用2者生产的D-异抗坏血酸钠均符合GB 8273—1987所规定的各项指标。

表4 利用2KG发酵液生产D-异抗坏血酸钠的各步收率

菌株	酸化收率	酯转化收率	精制收率
	%	%	%
K1005	93.34	88.09	81.11
A46	93.41	87.64	82.40

2.5 菌株A46与K1005的2KG发酵生产成本比较

在对菌株A46与K1005的发酵过程及2KG生产能力的比较中,同时也对其2KG生产成本(未考虑噬菌体流行造成的其他经济损失)进行了粗略的核算和比较(见表5所示)。从表5中可知,在生产环境中噬菌体大量存在的情况下,使用抗株A46比使用K1005菌株的2KG生产成本要低20%以上。

表5 A46与K1005的2KG发酵生产成本比较

菌株	原材料成本	能耗	直接人工费	合计
	/元·t ⁻¹	/元·t ⁻¹	/元·t ⁻¹	/元·t ⁻¹
A46	2701.13	610.46	44.18	3355.77
K1005	2938.63	1266.99	95.11	4300.73

3 结 语

荧光假单胞菌A46是一株优良的2KG产生菌,具有发酵周期短、发酵转化率高、对噬菌体抗性稳定的特点,其发酵产物适合于

D-异抗坏血酸钠的合成,可以应用于工业化大生产中。

参 考 文 献

1 蒋明珠,白照熙,张俊贤等.食品与发酵工业,1990,16(4):54-58

2 孙文敬,白照熙,谢红等.微生物学通报,1990,17(3):170-172

3 赵峰梅,孙文敬,王慕华等.工业微生物,2000,30(4):6-10

4 蒋明珠,白照熙,张俊贤等.工业微生物,1989,19(1):3-7

Study on Application of Phage-resistant Strain *Pseudomonas fluorescens* A46 in the Industrial Production of Sodium D-isoascorbate

Sun Wenjing¹ Zhao Fengmei¹ Huang Huiying²
Yang Qingwen¹ Guo Jinquan¹ Jiang Mingzhu¹

1(Shanxi Institute of Biology, Taiyuan, 030006)

2(Zhengzhou Biochemical Factory, Zhengzhou, 450007)

ABSTRACT *Pseudomonas fluorescens* A46 was a phage-resistant strain obtained from the mutation of the strain K1005 by using U. V. light as a mutagen. In the presence of phages, 2-keto-D-gluconic acid fermentation by *Pseudomonas fluorescens* A46 and its parent in 50 kL fermentor was studied. The results showed that *Pseudomonas fluorescens* A46 was indeed a phage-resistant strain and the resistance was stable, with shorter fermentation period and higher fermentation conversion rate than its parent. After 17 generation, its resistance against phages and 2-keto-D-gluconic acid producing ability had not changed. The fermentation product of *Pseudomonas fluorescens* A46 could be used in the synthesis of sodium D-isoascorbate.

Key words 2-keto-D-gluconic acid, *Pseudomonas fluorescens*, phage, phage-resistant strain, sodium D-isoascorbate

信 息 窗

日本利用豆腐渣制保健豆腐

日本将豆腐渣经处理或未经处理制保健型豆腐并已商品化。方法有:(1)豆腐渣经机械粉碎、微粉化,于 100℃加热杀菌 20 min,冷却、调 pH 4~6,温度 40~60℃,加入果胶酶、纤维素酶、半纤维素酶混合分解豆渣,制得呈浆状豆渣,用碳酸钠调整 pH 至 6.5,冷冻保存,制豆腐时,加到豆乳汁中与豆乳一起混匀,加凝固剂硫酸钙与葡萄糖酸内酯混合,充填入包装容器,加热冷却成保健豆腐,含植物蛋白、油酸、维生素

E、异黄酮、植物固醇、低分子食物纤维、多种糖,具有防癌、防骨质疏松等功效。(2)将大豆脱皮、粉碎到粒径 40 μm(最好 20 μm)加水混合,加消泡剂,加热、冷却,加凝固剂充填,加热、凝固、杀菌、冷却,充填豆腐。此法不分离豆渣。在制豆渣豆腐时,如果豆渣用 4~5 种酶分解后再与豆乳一起制豆腐,不仅口感好,还能使豆腐增产。

从稻叶、茎中提取抗老化成分用于功能食品

日本新潟县农业食品研究中心从青的稻叶及茎中提取出抗老化成分并申请专利及进入商品化。青稻叶与茎中含有防止细胞氧化、消除活性氧的酶,能防止人体受活性氧损害导致老化和各种疾病发生。这次开发的防老化成分的产品是绿色提取液,也可加

工成粉末,作功能食品添加剂加入到糕点、米团子等大米加工食品中,以及运动员饮料等中。由于该产品无味,应用范围广,产品原料价廉,开发应用于功能食品中潜力巨大。