

高产赤藓糖醇菌株 RH-UV-L4-F9 发酵条件的优化*

陈海燕, 刘俊梅, 王玉华, 胡耀辉

(吉林农业大学食品工程学院, 吉林长春, 130118)

摘要 以高产赤藓糖醇菌株 RH-UV-L4-F9 为研究对象, 采用生物统计方法分别对该菌株的发酵培养基和培养条件进行优化。发酵培养基最佳配比为葡萄糖 30%, 酵母膏 0.5%, 脲 1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%; 最适发酵条件为 34℃, 初始 pH 值 6.0, 摇床转速 180 r/min。最适条件下赤藓糖醇产量为 157.4 mg/mL。

关键词 高渗假丝酵母, 发酵条件, 赤藓糖醇

随着人们对功能性糖醇认识的不断深入, 赤藓糖醇需求量急剧上升^[1]。赤藓糖醇多采用耐高渗酵母发酵而成, 利用微生物发酵生产正成为研究的热点^[2]。笔者利用从自然界分离筛选得到的产赤藓糖醇的耐高渗假丝酵母为出发菌株, 对高渗假丝酵母菌株 RH-UV-L4-F9 发酵生产赤藓糖醇的工艺条件进行了优化, 确定了发酵工艺参数, 提高了产量, 为产业化生产及应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种

高渗假丝酵母 (*Candida mycoderma*) RH-UV-L4-F9, 本研究室构建并保存。

1.1.2 培养基

斜面培养基: 葡萄糖 2%, 酵母膏 0.5%, 脲 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, 琼脂粉 2%, pH 6.0。

发酵培养基: 葡萄糖 30%, 酵母膏 0.5%, 脲 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, pH 6.0。

种子培养基: 葡萄糖 20%, 酵母膏 0.5%, 脲 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, pH 6.0。

1.1.3 试剂

玉米浆, 市售; 麦芽粉、酵母膏、脲、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 MgSO_4 等均为 AR 级。

1.2 方法

1.2.1 发酵剂基质的优化

(1) 碳源: 单因素实验, 设计葡萄糖质量分数分别为 10%、20%、30%、40% 和 50%。

(2) 氮源: 分别采用酵母膏、玉米浆、麦芽粉、脲

和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。

(3) 无机盐: 选择 MgSO_4 、 CaCO_3 、 KH_2PO_4 、 NaCl 、 KCl 分别加入培养基, 检测赤藓糖醇产量。

1.2.2 发酵工艺参数的优化

对菌株 RH-UV-L4-F9 发酵影响较大的葡萄糖、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、酵母膏和脲(按单因素处理)进行正交试验, 正交设计表见表 1。

表 1 发酵剂正交试验因素和水平 $L_3(3^1)$

水平	因素		
	(A)葡萄糖/%	(B)酵母膏+脲/%	(C) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\%$
1	10	0.25+0.5	0.01
2	20	0.5+1.0	0.05
3	30	1.0+2.0	0.09

接种量的控制对细胞培养和代谢物积累起到重要作用^[3]。经单因素试验确定接种量为 8%。在保持培养基组分恒定的条件下, 控制发酵过程的各项主要影响指标, 包括发酵温度、初始 pH 值、转速。各指标如表 2 所示。

表 2 培养条件正交试验因素水平表 $L_3(3^1)$

水平	因素		
	(A)发酵温度/℃	(B)初始 pH 值	(C)转速/ $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$
1	30	5.5	160
2	34	6.0	180
3	38	6.5	200

1.2.3 分析方法

(1) pH 测定: 数显 pH 计。

(2) 生物量测定: 称重法。发酵液经高温灭酶 30 min, 冷却, 8 000 r/min 离心 10 min, 取沉淀洗涤 2 次, 置于 80℃ 干燥箱中干燥至恒重。

$$\text{生物量}/\text{g} \cdot \text{L}^{-1} = \frac{\text{菌体干重}}{\text{发酵液质量}}$$

(3) 赤藓糖醇含量测定

a. 高碘酸氧化法^[4]。

第一作者: 硕士研究生(胡耀辉为通讯作者)。

* 吉林省科技发展计划项目(No. 200302-04)

收稿日期: 2007-02-14, 改回日期: 2007-05-30

b. 高效液相色谱法——色谱柱: Hypersil NH₂ (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 上样量: 20 μL; 柱温: 40℃; 流动相: V(乙腈): V(水)=90:10; 流动速率: 1mL/min; 检测器: Waters 600/2410(示差折光检测器)。

(4) 葡萄糖含量的测定: 直接滴定法。

2 实验结果

2.1 发酵剂基质的优化

(1) 碳源: 菌株 RH-UV-L4-F9 从高渗环境筛选分离融合获得。不同碳源对赤藓糖醇产量的影响见图 1。

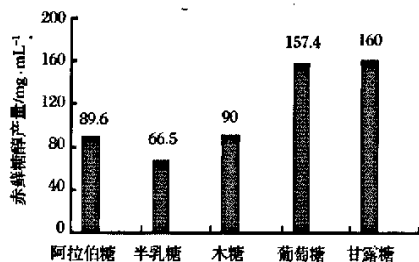


图1 不同碳源赤藓糖醇产量

由图1可知,以甘露糖为碳源时,赤藓糖醇产量较高;其次为葡萄糖,但甘露糖成本较高,故选用葡萄糖为发酵碳源。

(2) 氮源: 经试验检测,可利用氮源有酵母膏、玉米浆、麦芽粉、脲、(NH₄)₂SO₄, 结果如图2所示。

发酵后,以玉米浆和酵母膏对赤藓糖醇的产量影响较为明显,复配后发现,酵母膏和脲结合作为氮源,赤藓糖醇产量相对较高。

(3) 无机盐: 选择不同的无机盐,进行赤藓糖醇含量测定,结果如图3所示。

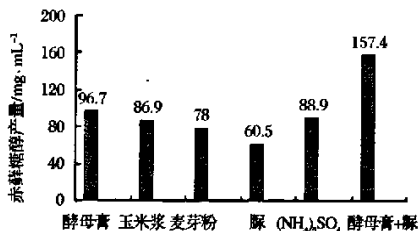


图2 不同氮源赤藓糖醇产量

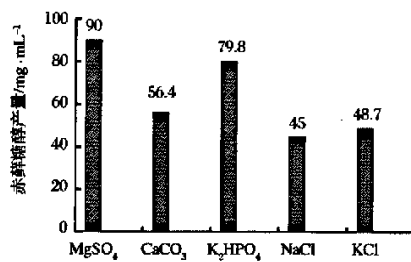


图3 不同无机盐赤藓糖醇产量

由图3可见,加入MgSO₄的发酵液中赤藓糖醇产量为90 mg/mL,相对较高。

2.2 正交试验结果分析

采用L₉(3⁴)正交表设计,以碳源、氮源、无机盐为试验因子,研究发酵培养基对赤藓糖醇产量的影响。试验处理方案和结果见表3和表4。

表3 培养基正交试验方差分析表

处理号	(A)葡萄糖/%	(B)酵母膏+脲/%	(C)MgSO ₄ ·7H ₂ O/%	(D)空列	赤藓糖醇产量/mg·mL ⁻¹
1	1(10)	1(0.25+0.50)	1(0.01)	1	42.6
2	1	2(0.50+1.00)	2(0.05)	2	44.8
3	1	3(1.00+2.00)	3(0.09)	3	43.0
4	2(20)	1	2	3	120.8
5	2	2	3	1	120.6
6	2	3	1	2	120.0
7	3(30)	1	3	2	122.8
8	3	2	1	3	124.0
9	3	3	2	1	122.0
K ₁	130.4	286.2	284.6		
K ₂	361.4	289.4	289.6		
K ₃	368.8	285.0	286.4		
k ₁	43.47	95.4	94.87		
k ₂	120.47	96.7	96.53		
k ₃	122.93	95.0	95.47		
R	79.46	1.47	1.06		

由表3可知,(1)由极差R值可以看出,影响赤藓糖醇产量的因素显著次序为A>B>C,即影响顺序为:葡萄糖,MgSO₄·7H₂O,酵母膏+脲。

(2)发酵法生产赤藓糖醇优化组合为A₃B₂C₂,即葡萄糖30%,酵母膏0.5%+脲1%,MgSO₄·7H₂O 0.05%。

最佳条件验证:最佳条件组合A₃B₂C₂和正交表

中产赤藓糖醇浓度较高的 $A_3B_2C_1$ 作二次平行试验。结果用 t 检法, 平均数用 \pm SD 表示, 结果如表 4。

表 4 最佳条件验证结果

处理	赤藓糖醇产量/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
$A_3B_2C_2$	$7.52 \pm 0.237A$
$A_3B_2C_1$	$7.30 \pm 0.0127B$

注: A 葡萄糖, B: 酵母膏+脲, C: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

由表 4 表明, 最佳条件组合 $A_3B_2C_2$ 的赤藓糖醇

产量高于正交表中 $A_3B_2C_1$ 的赤藓糖醇产量。因此, 发酵生产赤藓糖醇的培养基组合为葡萄糖 30%, 酵母膏 0.5%+脲 1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%。

2.3 培养条件的确定

综合最佳条件进行发酵, 通过对四因素三水平 9 种方案进行试验并跟踪检测赤藓糖醇的产量, 进行极差分析, 结果如表 5 所示。

表 5 培养条件正交试验结果 $L_9(3^4)$

处理号	(A) 发酵温度/ $^{\circ}\text{C}$	(B) 初始 pH 值	(C) 转数/ $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$	(D) 空列	赤藓糖醇产量/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
1	1(30)	1(5.5)	1(160)	—	120.2
2	1	2(6.0)	2(180)	—	142.3
3	1	3(6.5)	3(200)	—	135.0
4	2(34)	1	3	—	140.8
5	2	2	2	—	157.5
6	2	3	1	—	128.4
7	3(38)	1	3	—	133.2
8	3	2	1	—	119.5
9	3	3	2	—	150.8
K_1	397.5	418.5	368.1		
K_2	426.7	419.3	450.6		
K_3	403.5	414.2	409.0		
k_1	132.5	139.5	122.7		
k_2	142.2	139.8	150.2		
k_3	134.5	138.1	136.3		
R	7.7	0.3	13.9		

由表 5 可见, 试验中各因素影响发酵产赤藓糖醇能力的顺序依次是: 摇床转数、发酵温度、初始 pH。从因素水平变化趋势分析, 转数对产量的影响最大, 而 pH 变化不利于赤藓糖醇的合成, 其次为发酵温度、空气摇床转数。发酵过程中培养条件最佳组合为 $A_2B_2C_2$, 即: 发酵温度 34°C , 初始 pH 6.0, 转数 180 r/min 。

2.4 菌株 RH-UV-L4-F9 最适条件下的发酵产量

将融合菌株 RH-UV-L4-F9 接种到最佳的发酵培养液中, 优化培养, 每隔 24 h 取样分析, 测其赤藓糖醇含量、残留葡萄糖含量、pH 值, 如图 4 所示。

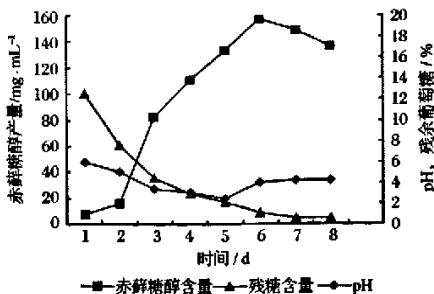


图 4 赤藓糖醇产量与发酵时间的关系

结果显示, 摇瓶培养 1 d 后, 有赤藓糖醇产生, 但产量较少, 到第 5 天、第 6 天产量达到 157.4 mg/mL , 整个发酵过程中, pH 值由初始 6.0 降到 2.5 以下, 第 5 天后回升到 3.5 左右。

3 讨论

(1) 培养基的营养因子对赤藓糖醇产量有很大影响。试验中优化了发酵培养基的碳源、氮源、无机盐比例, 以酵母膏和脲为复合氮源, 在工业化生产中达到节能降耗的目的。

(2) 在装液量相同的条件下, 通过改变摇床转速控制菌株的供氧量, 最终确定摇床转速为 180 r/min 。该酵母菌发酵产赤藓糖醇的适宜温度在 $30 \sim 38^{\circ}\text{C}$, 但适宜的发酵温度与各菌株的性能、底物浓度均有关系。随着温度的升高或降低, 酵母对数生长期滞后, 产赤藓糖醇时间也推迟。故适宜的发酵温度和适宜生长温度并不一致^[5-7]。本试验通过菌株后续生理特性试验验证了最适生长温度为 30°C , 发酵温度为 34°C 。

(3) pH 值对酵母的生命活动影响显著, 氢离子

能改变细胞原生质体的电荷,随着氢离子浓度的变化,细胞对营养物质的吸收和利用也会受到影响^[8,9],大部分酵母的生长最适 pH 值在 4.5~5.0,本试验得出 RH-UV-L4-F9 在 pH 4.0~6.5 范围内都能生长发酵,适宜的生长 pH 值是 6.0。

(4)针对性的比较了国内相关领域研究。吴燕、陆茂林等以突变株 B845 进了一系列的发酵工艺条件试验。但发酵因素仅对碳源、氮源进行了探讨^[10];有关研究人员从土壤、酿造食品、花粉等样品中分离赤藓糖醇产生菌的方法,获得的菌株在葡萄糖培养液中可产赤藓糖醇 32 mg/mL^[11],但并未对菌株的发酵条件进行系统的研究;郑州轻工业学院刘凤珠,张鑫以耐高渗酵母为出发菌株,采用紫外诱变处理,其摇瓶发酵产赤藓糖醇 24.9 g/L,对菌株的发酵条件如 pH 值、培养时间等未作优化研究^[12];江苏省微生物研究所以提高圆酵母(*Torula sp.*)B84512 为出发菌株,采取发酵罐流加补料方式生产赤藓糖醇^[13],指标为葡萄糖浓度、细胞数、赤藓糖醇浓度,对于该菌株的发酵条件未见报道。另外,日本和美国等国家虽起步较早,但研究重点为开发不同菌种生产赤藓糖醇^[14~15]。可以看出除流加补料发酵工艺外,相关研究的菌种产量均无明显优势。下一步将探讨 5 L 以上发酵罐流加补料,以弥补工业化生产的不足。

4 结 论

赤藓糖醇菌株 RH-UV-L4-F9 的优选培养基方案为葡萄糖 30%,酵母膏 0.5%+脲 1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%;发酵温度 34℃,初始 pH 6.0,转速 180 r/min。在此条件下,该菌株赤藓糖醇产量为 157.4 mg/ml,可以满足工业化生产需要,具有良好的应用前景。

Optimization of Fermentation Condition with Erythritol Strain RH-UV-L4-F9

Chen Haiyan, Liu Junmei, Wang Yuhua, Hu Yaohui

(College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

ABSTRACT Hyper-produced strain of erythritol was studied; the fermentation medium and conditions were optimized by the biotic statistical methods. The study showed that 30% of glucose, 0.5% of yeast paste, 1% of urea and 0.05% of $MgSO_4$ were the better components of the culture medium. The optimum fermentation conditions were: temperature 34℃, initial pH 6.0, rotation speed 180 rpm and fermentation period of 6d. Under the above conditions, the yield of erythritol reaches 157.4mg/ml. The results from the present study indicate that RH-UV-L4-F9 is a high yield strain on production of erythritol and present application opportunity in industry.

Key words Osmophilic yeast, fermentation conditions, erythritol

参 考 文 献

- 1 范光先,张海平,诸葛健.耐高渗酵母产赤藓糖醇的影响因素[J].江南大学学报,2001,20(2):133~136
- 2 金海如,方慧英,诸葛健.供氧对产丙三醇假丝酵母发酵研究[J].生物工程学报,2000,1(2):203~206
- 3 北京大学生物系生物化学教研室.生物化学实验指导[M].北京:高等教育出版社,1984
- 4 袁野,应向贤.高碘酸氧化法直接测定发酵液中赤藓糖醇[J].江南大学学报,2000,19(1):72~75
- 5 欧阳平凯等.发酵工程关键技术及其应用编[M].北京:化学工业出版社,2005.4
- 6 陈坚,隋国成,李寅,等.发酵工程试验技术[M].北京:化学工业出版社,2003.5
- 7 熊宗贵.发酵工艺原理[M].北京:中国医药科技出版社,1990
- 8 钱存柔,黄仪秀.微生物实验教程[M].北京:北京大学出版社,1999
- 9 尤新.功能性发酵制品[M].北京:中国轻工业出版社,2000.186~190
- 10 吴燕,吕慧敏,陆茂林,等.耐高渗酵母 B845 产赤藓糖醇的研究[J].江苏食品与发酵,2001(4):7~9
- 11 刘凤珠,张鑫.产赤藓糖醇菌种的诱变育种[J].生物技术,2005,15(4):23
- 12 吴燕,吕慧敏,施大林,等.新型甜味剂——赤藓糖醇产生菌的筛选[J].生物技术,2005,4:17~20
- 13 Kiyoji, Hattori, Takeo Suzu K L Production of erythritol byn-Alkane-grown yeasts[J]. Agr Biol Chem, 1974, 38 (3), 581~586
- 14 Jin B Park, Cheol Yook, Yong K Park. Production of erythritol bynewly isolated osmophilic *Trichosporon sp.* [J]. Starch/Starke, 1998, 50(2~3):120~123
- 15 Shie Jea Lin, Chiou Yen Wen, Jian Ching Liao. Screening and prduction of erythritol bynewly isolated *Osmophilic* yeast-like fungi[J]. Proce Biochemistry, 2001, 36:1 249~1 258