

酵母内海藻糖积累条件的优化*

王 兰 肖冬光 张 正 李 绩

(天津轻工业学院食品工程系, 天津, 300222)

摘 要 对面包酵母(BY-11)海藻糖积累条件进行了较系统的研究, 采用了 PB 和响应曲面设计法, 得到了 1 个优化的培养基。采用此培养基, 以 3 g/L(以酵母干固体计)的接种量, 37℃ 震荡培养 3 h 可积累海藻糖 0.96 g/L, 从而大大提高了海藻糖的产量, 为工业生产提供了可行性。

关键词 面包酵母 海藻糖 积累条件 优化

酵母提取法是海藻糖最主要的合成方法, 而且较高的海藻糖含量一般是在物种抵抗外界应力时才能产生。研究发现, 培养基内 C、N、S、P 的缺乏可引起海藻糖的大量积累, 即当营养缺乏, 生长受限时海藻糖才开始积累^[1~5]。鉴于此, 在对海藻糖积累条件的设计上, 我们主要从营养饥饿方面入手, 只供给酵母适量的碳源及少量的微量元素和维生素, 并严格限制 N 源, 利用 PB 法及 RSA 法^[6]对培养基组分进行优化, 从而获得优化培养基。

1 材 料

1.1 使用菌种

面包酵母 BY-11(本研究室保存)

1.2 主要培养基

1.2.1 种子培养基

葡萄糖 4 g、蛋白胨 2 g、酵母膏 1 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g、 K_2HPO_4 0.1 g 溶于 100 mL 水中, 121℃ 灭菌 20 min。

将已灭菌的装有 100 mL 培养基的 500 mL 三角瓶内接入液体管面包酵母 BY-11, 30℃ 振荡培养 16~24 h, 菌种离心并用无菌水洗涤 2 次备用。

1.2.2 发酵培养基

葡萄糖 2 g、NaCl 10 mg、 K_2HPO_4 12.5

mg、 KH_2PO_4 87.5 mg、KI 0.01 mg、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 50 mg、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mg、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1 mg、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 mg、 CoCl_2 0.05 mg 溶于 100 mL 蒸馏水中, 另加入微量元素母液 0.1 mL、维生素母液 0.1 mL。121℃ 灭菌 15 min。

发酵培养实验接以上种子 3 g/L(以酵母干固体计), 37℃ 振荡培养 3 h 后, 取发酵液 10 mL 离心, 沉淀酵母泥用硫酸-蒽酮法测定海藻糖含量。

1.3 分析方法

海藻糖分析采用硫酸-蒽酮法^[7]。

细胞干重测定见参考文献[7]。

2 结果与讨论

2.1 酵母内海藻糖积累的主要影响因素

2.1.1 缓冲液浓度对海藻糖积累的影响

实验过程中的培养基以 Na_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲液为液态基质, 对不同浓度的缓冲液, 实验结果(表 1)表明, 80 mmol/L 的缓冲液浓度最有利于海藻糖的积累。

2.1.2 pH 的影响

据报道, pH 对海藻糖的积累影响较大。为此, 在缓冲液浓度确定的基础上采用不同 pH 的缓冲液进行实验, 结果(表 2)表明,

第一作者: 博士研究生, 工程师。

* 天津市自然科学基金资助项目(No. 013609711)

收稿时间: 2001-08-04, 改回时间: 2001-10-14

pH4.9 最有利于海藻糖的积累。这可能是由于海藻糖的中性分解酶(最适 pH7.0)活性的缘故^[8,9]。

表 1 不同缓冲液浓度对海藻糖积累的影响

缓冲液浓度/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	30	60	70	80	90	100	150
初始 pH 值	5.3	5.3	5.3	5.4	5.4	5.4	5.4
发酵结束时 pH 值	4.1	4.3	4.4	4.5	4.7	4.8	5.1
海藻糖质量分数/%	5.0	5.13	6.8	7.8	7.6	7.1	6.5

表 2 pH 对海藻糖积累的影响

初始 pH 值	4.5	4.9	5.4	5.8	6.4	6.9
发酵结束时的 pH 值	3.8	4.0	4.3	4.9	5.8	6.3
海藻糖质量分数/%	9.04	11.1	8.9	8.77	8.71	8.23

2.1.3 添加盐及其盐质量分数对海藻糖积累的影响

添加盐是为了增加酵母菌的环境渗透压从而有利于海藻糖的积累。本实验即用 KCl 和 NaCl 做对比并做不加盐为对照,结果见表

3。从表中可以看出,添加盐后的酵母菌海藻糖的积累明显好于对照。同时,添加 NaCl 要优于添加 KCl。培养基中加入 1%~1.5% 的 NaCl 可使酵母中海藻糖的积累明显提高。

表 3 加盐对海藻糖积累的影响

NaCl 质量分数/%	0.5	1	1.5	2	2.5	不加盐对照
海藻糖质量分数/%	7.75	9.71	9.60	8.87	8.40	
KCl 质量分数/%	0.5	1	1.5	2	2.5	
海藻糖质量分数/%	7.79	7.95	8.27	7.74	7.69	4.4

2.1.4 初始糖质量分数对海藻糖积累的影响

在酵母中,海藻糖是由 UDP-葡萄糖和 6-*p*-葡萄糖经 2 步反应而形成的^[1,2],因此,它的最初底物为葡萄糖,它在发酵初期的质量分数将直接影响着酵母菌内海藻糖的积

累。本实验,为了保持不同的葡萄糖初始质量分数而又不致使葡萄糖在发酵过程中过早消耗完,采用分批添加葡萄糖的方法,使每个实验在发酵过程中的葡萄糖浓度均保持在其初始葡萄糖浓度之下。

表 4 初始糖质量分数对海藻糖积累的影响

初始糖质量分数/%	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0
海藻糖含量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0.847	0.896	1.033	1.179	1.013	0.995	0.818	0.696

注:本实验的接种量为 6 g/L(以酵母干固体计)。

初始糖质量分数对海藻糖的积累影响较大。葡萄糖质量分数太低,由于没有足够的底物使得海藻糖的产量较低,但若过高,对海藻糖合成酶系的活性有抑制作用,同样不利于海藻糖的积累。

2.2 培养基内微量元素和维生素筛选的 Plackett-Burman 实验

发酵培养基内各组分对海藻糖积累的影

响因涉及的因素多,很难用 1 种常规的方法处理。Plackett-Burman 是 1 种以不完全平衡块为原理的实验设计,能够从众多变量中快速、有效的筛选出最为重要的一些因素,供进一步详细研究用,具有数据处理简单,可适用于多个实验因子等优点。

本实验对培养基中部分微量元素和维生素对酵母体内海藻糖积累的影响情况^[10]进

行了研究。选用实验次数 $N = 12$ 的 Plackett-Burman 实验设计,考察了 9 个因素 X_1, X_2, \dots, X_9 。每个因素取 2 个水平(表 5),以发酵液内海藻糖的含量 $Y(\text{g/L})$ 为响应值。实验各培养基组分按表 6 安排。

根据 SAS 分析的输出结果(见表 5),从 T-检验结果可知, Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、生物素和对氨基苯甲酸这 5 个因素的可信度分别为 99.2%、93.6%、95.5%、90.3%、96.1%,高于 90%,作为重要因素。 X_2 、 X_6 、 X_8 为正效应, X_3 、 X_5 为负效应。PB 实验已从 9 个因素中选出了 5 个因素,而其他 4 个因素取 PB 实验的初始浓度。

2.3 响应面分析法(RSA)优化培养基配比

响应面分析法(RSA)是数学与统计学相结合的产物,由于采用了合理的试验设计,能以最经济的方式,以很少的实验数量和时间对实验进行全面研究,从而取得明确、有目的结论。RSA 法在培养基优化上已经证明很有效。通过以上的重点因素选择实验,我们确定了 5 个对海藻糖积累影响显著的因素,以这 5 个因素为研究对象,进一步考察它们对海藻糖积累的影响,并对培养基的组成进行优化。设 5 个因素为 X_1, X_2, X_3, X_4, X_5 为自变量,以培养基内海藻糖的含量 Y 为响应值,利用 SAS 软件设计了旋转中心组合设计,其因素-水平见表 7,实验设计及结果见表 8。

表 5 以 Plackett-Burman 实验设计各因素、水平及影响效果

各种因素的质量浓度		Coded levels		T-test	Prob> T	Ranking
/10mg·L ⁻¹		-1	+1			
X1	MgSO ₄ ·7H ₂ O	40	50	-1.011	0.4186	8
X2	CaCl ₂ ·2H ₂ O	8	10	10.974	0.0082	1*
X3	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.8	1.0	-3.749	0.0644	4*
X4	CoCl ₂	0.04	0.05	2.315	0.1466	6
X5	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.03	0.04	-4.508	0.0458	3*
X6	生物素	0.03	0.04	2.960	0.0977	5*
X7	V _{B1}	0.6	0.8	1.054	0.4026	7
X8	对氨基苯甲酸	0.03	0.04	4.881	0.0395	2*
X9	肌醇	0.3	0.4	-0.136	0.9041	9

注:* >90%的可信度。

表 6 Plackett-Burman 实验设计及响应值

OBS	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	Y/mg·mL ⁻¹
1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	0.45
2	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	0.22
3	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0.228
4	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	0.183
5	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	0.617
6	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	0.324
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	0.540
8	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	0.201
9	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	0.651
10	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	0.221
11	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	0.401
12	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	0.249

表 7 5 因素 5 水平实验设计

因素	编码	水平取值	因素取值/mg·(100 mL) ⁻¹
CaCl ₂ ·2H ₂ O	X1	-2, -1, 0, 1, 2	6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 14.0
MnCl ₂ ·4H ₂ O	X2	-2, -1, 0, 1, 2	0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	X3	-2, -1, 0, 1, 2	0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05
生物素	X4	-2, -1, 0, 1, 2	0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06
对氨基苯甲酸	X5	-2, -1, 0, 1, 2	0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06

表 8 响应面分析实验结果

编号	X1	X2	X3	X4	X5	Y/g·L ⁻¹	编号	X1	X2	X3	X4	X5	Y/g·L ⁻¹
1	0	0	0	-2	0	0.675	17	0	0	0	0	0	0.622
2	1	1	1	-1	-1	0.641	18	-1	-1	1	1	1	0.540
3	-1	1	1	-1	1	0.633	19	0	0	0	0	2	0.656
4	-1	1	-1	-1	-1	0.566	20	0	0	0	0	0	0.669
5	1	-1	1	-1	1	0.585	21	-1	-1	-1	-1	1	0.561
6	-1	-1	1	-1	-1	0.575	22	1	1	-1	-1	1	0.687
7	-2	0	0	0	0	0.545	23	2	0	0	0	0	0.660
8	0	0	0	0	-2	0.590	24	0	-2	0	0	0	0.586
9	-1	-1	-1	1	-1	0.572	25	1	1	-1	1	-1	0.491
10	-1	1	-1	1	1	0.493	26	1	-1	-1	1	1	0.545
11	0	0	0	0	0	0.633	27	0	0	0	0	0	0.626
12	1	1	1	1	1	0.581	28	0	0	2	0	0	0.483
13	1	-1	1	1	-1	0.634	29	0	0	0	0	0	0.631
14	0	0	0	0	0	0.622	30	1	-1	-1	-1	-1	0.581
15	0	2	0	0	0	0.693	31	0	0	-2	0	0	0.496
16	0	0	0	2	0	0.588	32	-1	1	1	1	-1	0.619

据响应面分析实验结果,可由计算机回归方程各项的方差分析表(表 10)、RSA 程序计算得到回归方程各系数(表 9)及

表 9 回归方程式及回归系数取值

回归方程式	$Y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_4x_4 + a_5x_5 + a_{12}x_1x_2 + a_{13}x_1x_3 + a_{14}x_1x_4 + a_{15}x_1x_5 + a_{23}x_2x_3 + a_{24}x_2x_4 + a_{25}x_2x_5 + a_{34}x_3x_4 + a_{35}x_3x_5 + a_{45}x_4x_5 + a_{11}x_1^2 + a_{22}x_2^2 + a_{33}x_3^2 + a_{44}x_4^2 + a_{55}x_5^2$										
回归系数	a_0	a_1	a_2	a_3	a_4	a_5	a_{12}	a_{13}	a_{14}	a_{15}	
系数取值	0.634	0.013	0.0097	0.016	-0.018	0.0074	0.0058	-0.0086	-0.015	0.0035	
回归系数	a_{23}	a_{24}	a_{25}	a_{34}	a_{35}	a_{45}	a_{11}	a_{22}	a_{33}	a_{44}	a_{55}
系数取值	0.0039	-0.027	0.0068	0.021	-0.0066	-0.01	-0.0079	0.0014	-0.036	-0.0006	-0.0028
$R^2 = 0.8664$											

表 10 回归方程各项的方差分析表

Regression	Degress of Freedom	R-Square	F-Ratio	Prob>F
Linear	5	0.2109	3.472	0.0397
Quadratic	5	0.38971	6.417	0.0050
Crossproduct	10	0.2658	2.189	0.1074
Total Regress	20	0.8664	3.567	0.0172

从表 9、表 10 可看出,回归方程的决定系数 $R^2 = 0.8664$ 且 F-检验极显著,说明所拟合的回归方程合适。回归方程的一次项(96%)和二次项(98.5%)的 F-检验极显著,交互项(89%)的显著性一般。说明响应面分析所选的 5 个因素的主效应显著,同时,各因素间仍存在一定的交互作用。各因素对酵母菌体内海藻糖的积累影响较为复杂。

由于实验因子不但存在着主效应,而且

还存在着因子间各种复杂的互作效应,因此很难单从主效应和互作效应分析中找到最佳技术组合。本实验即是根据求得的多项式回归方程利用计算机程序求得最佳组合为:Ca-Cl₂·2H₂O 130 mg/L、MnCl₂·4H₂O 1.2 mg/L、ZnSO₄·7H₂O 0.25 mg/L、生物素 0.2 mg/L、对氨基苯甲酸 0.6 mg/L。酵母菌体内海藻糖积累可达 0.99 g/L。

由于以上最佳组合未包含在 RSA 的 32 个实验中,为了进一步确认计算结果,按最佳条件做了 3 个重复的验证实验,以 3 g/L(以酵母干固体计)的接种量,37℃ 振荡培养 3 h 即得海藻糖分别为 0.95 g/L、0.96 g/L、0.98 g/L,平均为 0.96 g/L,即酵母菌体内海藻糖积累可达 0.96 g/L。

3 结 论

(1) 酵母内海藻糖的积累需要有合适的外界环境, 研究表明 pH4.9 最有利, 可能的原因是在此 pH 条件下, 用于分解胞内海藻糖的中性海藻糖分解酶的活性受到了抑制, 分解减少, 使得海藻糖大量积累。

(2) 葡萄糖是海藻糖合成的最初底物, 较高和较低的底物质量分数均不利, 2% 是最合适的葡萄糖浓度。

(3) 在培养基内添加 1% ~ 1.5% NaCl 可增加渗透压, 利于海藻糖的积累。

(4) 本研究应用了 PB 及响应面实验设计对 9 种维生素和微量元素进行筛选, 根据方程求出最佳组合为 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 130 mg/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 12 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 mg/L, 生物素 0.2 mg/L, 对氨基苯甲酸 0.6 mg/L, 酵母菌体内海藻糖积累可达 0.96 g/L。

综合以上实验结果, 酵母细胞内利于海藻糖的积累培养基为: 葡萄糖 2 g、NaCl 1 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 40 mg、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 13 mg、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.2 mg、 CoCl_2 0.05 mg、 $\text{ZnSO}_4 \cdot$

$7\text{H}_2\text{O}$ 0.025 mg、生物素 0.02 mg、 V_{B_1} 0.8 mg、对氨基苯甲酸 0.06 mg、肌醇 0.3 mg 溶于 100 mL 80 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ (pH4.9) 缓冲液。接种量 3 g/L (以酵母干固体计), 培养温度 36℃ ~ 37℃, 培养时间 3 h, 即可获得 0.96 g/L 的海藻糖。

参 考 文 献

- 1 戴秀玉等. 微生物学通报, 1995, 22(2), 102 ~ 104
- 2 程 池. 食品与发酵工业, 1996, 22(1), 59 ~ 64
- 3 Newman Y M, Ring S G. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 1993, 11, 263 ~ 294
- 4 Johan M Thevelein. Microbiological Reviews, 1984, 48, 42 ~ 59
- 5 John K et al. Appl. Environ. Microbiol., 1996, 62(5): 1563 ~ 1569
- 6 Douglas C Montgomery. 实验设计与分析. 北京: 中国统计出版社, 1998
- 7 史戈峰, 莫湘筠. 食品与发酵工业, 1999, 25(3): 15 ~ 18
- 8 Solomon N. FEBS Letters, 1996, 386, 235 ~ 238
- 9 John L. Biochem. J., 1984, 219, 511 ~ 518
- 10 Junichi M et al. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1996, 4, 315 ~ 319

Optimization of Trehalose Accumulation Conditions in Baker's Yeast

Wang Lan Xiao Dongguang Zhang Zheng Li Ji

(Department of Food Science, Tianjin University of Light Industry, Tianjin 300222)

ABSTRACT Systematic studies were carried out on the optimization of the composition of medium which accumulated the largest amount of trehalose in baker's yeast. This optimizing medium was formulated via Plackett-Burman design and response surface analysis (RSA). Using this optimizing medium, BY-11 accumulated 0.96 g/L trehalose after agitation cultivation at 37℃ for 3h. This method provided the possibility of industrial-mass production.

Key words baker's yeast, trehalose, accumulation condition, optimization

英国啤酒市场

自 1995 年以来, 英国 Lager 和 ale 啤酒的产量均下降了 1.1%。2000 年 ale 和 Lager 啤酒的销售量分别是 307.3 万 t 和 303 万 t, 总销量为 610 万 t, 其中 85% 的啤酒是通过酒吧和俱乐部售出的。英国的出口量自 1991 年起每年上升 9.4%, 进口量每年上升 1.6%。