

发酵法制核黄素

李 嵘 余俊红 吴佩琮 陆文清

(无锡轻工大学生物工程学院, 无锡, 214036)

摘要 以实验用 *E. ashbyii* As 2.481 为对象, 研究了菌种特性, 并对发酵培养基配方及摇瓶工艺条件进行了优化。研究结果: 发酵培养基以葡萄糖、蛋白胨、玉米浆为主要原料; 发酵起始 PH = 6.8; 500ml 和 250ml 三角瓶最佳装液量分别是 60 ~ 70ml 和 20 ~ 30ml; 接种量为 10%, 在振动次数 100r/min, 振幅 8 ~ 10cm 的摇床上进行摇瓶。以豆油或油酸钠为促生因子, 核黄素产量从 0.1 g/L 提高到 0.6g/L。

关键词 核黄素; 发酵; 正交试验法

中图分类号 TQ 467.2

0 前 言

核黄素又称 V_{B2}, 也称维生素 G 或乳黄素, 属水溶性。它对生物生命活动不可缺少, 是构成黄素酶的必要成分, 直接参与碳水化合物、蛋白质、脂肪代谢作用^[1]。如果食物中缺少核黄素, 人体会因长期缺乏核黄素而产生一系列健康问题^[2]。

核黄素广泛应用于医药、食品、饲料工业。目前, 国内外市场对核黄素的需求量日益增加, 售价稳中有升, 而我国现在年产量不足 200 t^[3]。造成国内市场供不应求, 所以大力发展我国的核黄素工业愈显重要。核黄素工业生产有抽提法, 化学合成法和微生物发酵法。微生物发酵属于生物化学过程, 无毒安全, 且转化率高。发展前景十分广阔。但在生产上面临较多的难题, 制约了核黄素工业的迅速发展。

作者从核黄素发酵的基本条件入手, 摸索合适的工艺条件, 结合菌种选育, 以提高核黄素的生产水平。

1 实验材料与方法

1.1 出发菌株

阿氏假囊酵母(*Ecemothecium ashbyii* As 2.481) 中科院微生物研究所保藏菌株。

1.2 培养基

1.2.1 种子培养基

葡萄糖 2%， 蛋白胨 1%， 玉米浆 1%，
NaCl 0.1%， K₂HPO₄ 0.15%， MgSO₄·7H₂O 0.015%，
FeSO₄·7H₂O 2.3×10⁻⁶， ZnCl₂ 0.01%， CoSO₄·7H₂O 1.5×10⁻⁶，
MnSO₄ 2.5×10⁻⁸， pH 6.8； 0.1MPa 压力下灭菌 25min.

1.2.2 发酵培养基(改良后培养基)

葡萄糖 3%， 蛋白胨 0.5%， 玉米浆 1%，
NaCl 0.1%， K₂HPO₄ 0.15%， MgSO₄·7H₂O 0.05%，
FeSO₄·7H₂O 2.3×10⁻⁶， ZnCl₂ 0.01%， CoSO₄·7H₂O 1.5×10⁻⁶，
MnSO₄ 2.5×10⁻⁸， 豆油 1%； pH 6.8； 0.1MPa 压力下灭菌 25min.

1.3 测定方法

1.3.1 核黄素含量的测定 采用分光光度计法^[4]，由标准曲线查出 VB₂ 浓度。

1.3.2 还原糖的测定 3,5-二硝基水杨酸比色定糖法测定^[5]。

2 结果与分析

2.1 *E. ashbyii* 细胞生长曲线的测定

真菌的生长过程分延滞期、迅速生长期和衰退期。本菌种细胞生长曲线测定结果见图 1。

结果表明,0~20h, *E. ashbyii* 处于延滞期; 20~60h, 该菌处于生长期, 其中 25~40h, 菌体增长速度最快。笔者采用培养 30~36h 时, 处于迅速生长期的种子。60h 之后, 该菌进入衰退期。

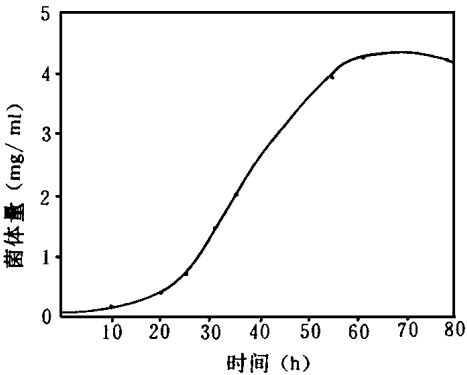


图 1 细胞生长曲线

2.2 摇瓶发酵条件的优化

2.2.1 正交试验确定碳源、氮源、玉米浆的浓度配比 结果见表 1。

表 1 正交试验的安排及实验结果

试验号	A 葡萄糖	B 蛋白胨	C 玉米浆	x_i 核黄素产量 mg/L	$X_i(x_i - 60)$
一	1(1.5%)	1(0.5%)	1(0.5%)	62.8	2.8
二	1	2(1.0%)	2(1.0%)	58	- 2.0
三	1	3(1.5%)	3(1.5%)	56.5	- 3.5
四	2(2.0%)	1	3	71.2	11.2
五	2	2	1	57.2	- 2.8
六	2	3	2	75.0	15.0
七	3(3.0%)	1	2	113.5	53.5
八	3	2	3	87.3	27.3
九	3	3	1	80.4	20.4
K ₁	- 2.7	67.5	20.4		
K ₂	23.4	22.5	66.5		
K ₃	101.2	31.9	35		
R	103.9	45	46.1		
ΣK_i^2	10796.29	6080.11	6063.41		

根据极差, 因素的主次排列是 A $\xrightarrow{\text{主}}$ C $\xrightarrow{\text{次}}$ B, 较佳配比为 A₃B₁C₂, 即葡萄糖 3. 0%, 蛋白胨 0. 5%, 玉米浆 1. 0%.

2. 2. 2 正交试验确定无机盐的浓度 结果见表 2.

表 2 无机盐离子正交试验安排及结果

试验号\ 因子	E(Mg ²⁺)	G(K ⁺)	F(Na ⁺)	x_i (核黄素产量 mg/L)	$X_i(x_i - 120)$
一	1(0. 05) %	1(0. 10%)	1(0. 10%)	148. 8	28. 8
二	1	2(0. 15%)	2(0. 20%)	123. 4	3. 4
三	1	3(0. 20%)	3(0. 30%)	114. 2	- 5. 8
四	2(0. 10%)	1	3	121. 1	1. 1
五	2	2	1	140. 4	20. 4
六	2	3	2	113. 4	- 6. 6
七	3(0. 20%)	1	2	114. 2	- 5. 8
八	3	2	3	142. 7	22. 7
九	3	3	1	120. 3	0. 3
K ₁	26. 4	24. 1	49. 5		
K ₂	14. 9	46. 5	- 9		
K ₃	17. 2	- 12. 1	18		
R	11. 5	58. 6	58. 2		
ΣK _i ²	1214. 81	2889. 47	2855. 25		

根据极差, 主次因素为 F $\xrightarrow{\text{主}}$ G $\xrightarrow{\text{次}}$ E, 可选 E₁G₂F₁, 即 MgSO₄ · 7H₂O 0. 05%, K₂HPO₄ 0. 15%, Nacl 0. 1%.

2. 2. 3 Cu²⁺ 和 Ca²⁺ 对核黄素产率的影响 发酵培养基中需含有微量的金属离子成分, 许多文献对 Cu²⁺ 和 Ca²⁺ 的作用效果看法不一^[6]. 对此, 做 Cu²⁺ 和 Ca²⁺ 对产核黄素的影响的实验时, 取文献中报道的浓度水平. 即 Cu²⁺ 的浓度为 2. 5×10⁻⁸, Ca²⁺ 浓度为 0. 01%. 对含 I (Cu²⁺ 又含 Ca²⁺), II(只含 Cu²⁺), III(只含 Ca²⁺), IV((不含 Cu²⁺ 和 Ca²⁺)) 四种情况安排实验, 结果见表 3.

表 3 Cu²⁺ 和 Ca²⁺ 对核黄素产率的影响

试验号	测试内容	核黄素产量 (mg/L)	发酵结束时 pH
I	含 Cu ²⁺ , Ca ²⁺	159. 7	6. 8
II	含 Cu ²⁺	264. 7	6. 5
III	含 Ca ²⁺	142. 3	7. 0
IV	不含 Cu ²⁺ , Ca ²⁺	261. 1	6. 5

结果表明: 1) 微量 Cu²⁺ 的加入在实验浓度范围内时对细胞没有毒害作用, 对产核黄素的影响不大; 2) 微量 Ca²⁺ 的加入对产核黄素有负作用; 3) Ca²⁺ 加入使发酵结束时 pH 值升高.

2. 2. 4 初始 pH 对核黄素产率的影响 实验结果见图 2.

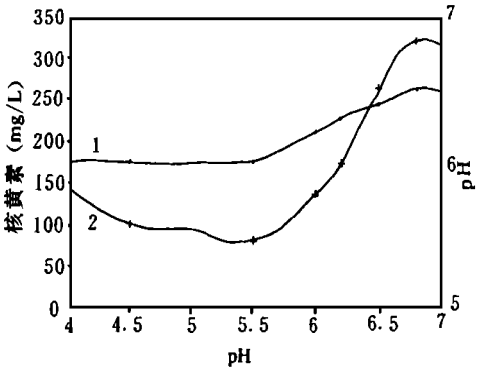


图 2 初始 pH 与核黄素产率关系图
1 发酵终点 pH 2 核黄素产量

图 2 表明: 1) 初始 pH 高有利于产核黄素, 当初始 pH = 6. 8, 核黄素产量较多. 2) 发

酵终点时 pH 与核黄素产量有某种联系。初始 pH 高, 发酵终点时 pH 也高, 发酵就完全, 核黄素产量也高。

2. 2. 5 装液量对核黄素产率的影响 实验结果见图 3.

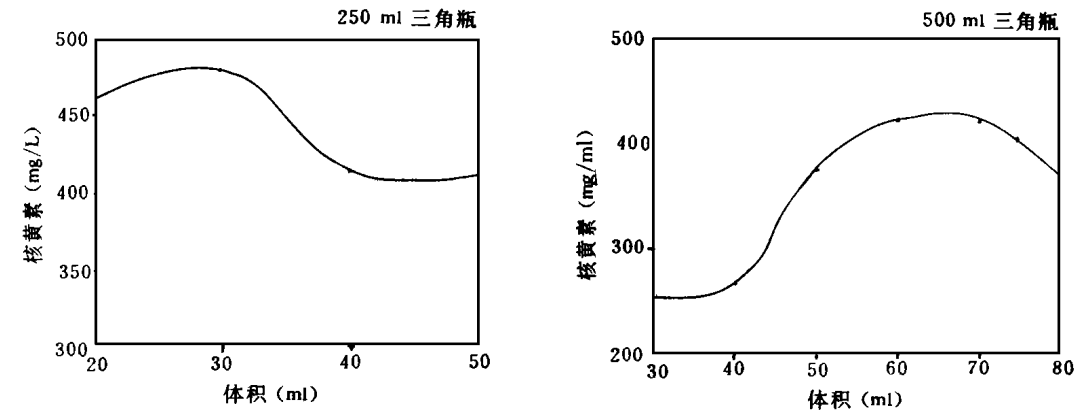


图 3 装液量对核黄素产率的影响

结果表明: 对于 250ml 三角瓶, 25~30ml 的装液量较佳; 对于 500ml 三角瓶, 60~70ml 的装液量较佳。

2. 2. 6 接种量对核黄素产率的影响 实验结果见表 4.

结果表明: 对于 250ml 和 500ml 三角瓶, 接种量为 10% 时最佳。

表 4 接种量对核黄素产量的影响

接种量 (%)	产量 (mg/L)		接种量 (%)	产量 (mg/L)	
	I	II		I	II
2	275. 7	304. 3	15	430. 5	405. 7
5	280. 2	350. 2	20	340. 2	410. 2
10	535. 5	530. 5			

注: I 250ml 三角瓶装液量 30ml;
II 500ml 三角瓶装液量 60ml.

2. 2. 7 促生因子的添加对核黄素产率的影响 实验结果见图 4.

结果表明: 1) 添加豆油和油酸钠效果最佳, 产量提高 3 倍以上。 2) 骨胶也有一定的促产作用, 干酪素和甘氨酸的促产作用有限。

2. 2. 8 豆油的补加实验 实验表明, 豆油是效果显著的促生因子。根据核黄素是次级代谢产物, 且菌增殖和发酵过程分开等特点, 我们以起始加入豆油为对照, 不同时间添加豆油, 观测添加时间对核黄素产率的影响, 结果见图 5.

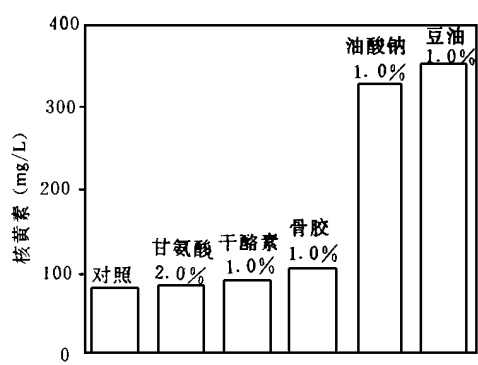


图 4 各促生因子对核黄素产率的影响

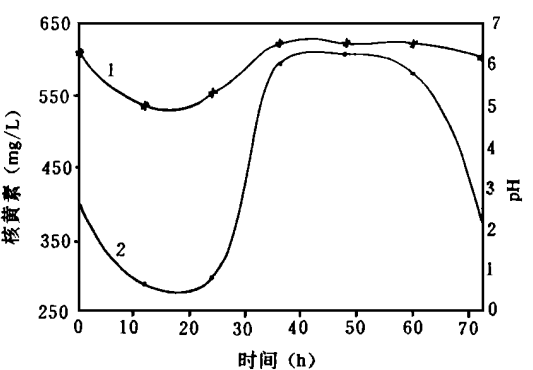


图 5 豆油的添加时间对核黄素产率的影响

结果表明, 豆油在 36~60h 内添加, 比起始加入效果好。

3 结 论

核黄素的生物合成与积累是一个复杂代谢过程, 影响因素很多, 主要有碳源、氮源、玉米浆、无机盐、微量离子、促生因子、通风量、接种量和 pH 等, 作者针对这些因素作了初步探索, 高产菌株的选育和培养条件的进一步改进是提高核黄素产量的最主要因素, 有关研究将继续深入下去。

参 考 文 献

- 1 无锡轻工业学院, 河北轻工业学院合编. 工业发酵(下册). 中国财经出版社, 1962
- 2 杨 森等. 食用维生素. 基础知识. 定量方法. 中国环境科学出版社, 1989
- 3 食品饲料添加剂信息. 1994. 3
- 4 黄伟坤等. 食品检验与分析. 轻工业出版社, 1989
- 5 张龙翔等. 生化实验方法和技术. 高等教育出版社, 1989
- 6 Bailey R B, et al. A Fermentation Process for Riboflavin Producing Organisms, A1 : C12P 25/00, C 12N, 1/ 16, 1/ 12, 1/ 20, US, PCT WO 92/1060
- 7 H. J 李姆(德). 工业微生物学. 科学出版社, 1975
- 8 陈驹声. 近代工业微生物学(下册). 上海科学出版社, 1982
- 9 Kolonne S, et al. Effect of pH on Exocellular Riboflavin Production by *Eremothecium Ashbyii*, Biotechnology Letters, 1994; 16(1): 79~84

Studies on Fermentation of Riboflavin

Li Rong Yu Junhong Wu Peizong Lu Wenqing

(School of Bioengineering, Wuxi University of Light Industry, Wuxi, 214036)

Abstract This thesis studied the culture conditions of producing strain of riboflavin. The initial strain was *E. ashbyii* As 2. 481. The characteristics of the strain, the composition of fermentation medium and some culture conditions were investigated. Glucose, peptone and C. S. L were taken as the main ingredients. It showed that the initial pH= 6. 8, 60~70ml culture liquid in 500 ml flask or 20~30ml in 250ml flask, and the inoculum size being 10% volumn of that of the medium would be beneficial to riboflavin prduction. It also showed that oil and oleic acid sodium were good promoters. The riboflavin yield of the initial strain was about 0. 1g/L. After strain purification and culture conditions optimization, the yield was raised to 0. 6g/L.

Key-words riboflavin; fermentation; orthogonal test