

文章编号 :1009-038X(2001)02-0133-04

耐高渗酵母产赤藓糖醇的影响因素

范光先, 张海平, 诸葛健

(无锡轻工大学生物工程学院, 江苏无锡 214036)

摘要:球拟酵母 OS-194 是一株单产赤藓糖醇的耐高渗酵母, 该菌株高产赤藓糖醇的最佳培养基配方为: 葡萄糖 10 g/dL, 酵母膏 0.5 g/dL, 尿素 0.1 g/dL. 最适培养条件是在摇瓶转速 150 r/min 的条件下于 35 °C 培养 4 d. 在上述培养条件下, 该菌株赤藓糖醇的耗糖转化率高达 29.6%. 磷是限制 OS-194 菌株高产赤藓糖醇的主要因素, 当培养液中的磷质量浓度低于 31.5 mg/L 时, 赤藓糖醇的产量最高; 随着磷质量浓度的升高, 该菌株赤藓糖醇的产量降低, 而酒精的产量和生物量却有明显升高. 同时, OS-194 菌株还能利用果糖、蔗糖和 D-甘露糖产赤藓糖醇.

关键词:耐高渗酵母, 赤藓糖醇, 影响因素

中图分类号: Q546

文献标识码: A

Factors Affecting Erythritol Production by An Osmophilic Yeast

FAN Guang-xian, ZHANG Hai-ping, ZHUGE Jian

(School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036, China)

Abstract: Spherical yeast OS-194 is an only erythritol production osmophilic yeast. 10 percent of glucose, 0.5 g/dL for yeast extract and 0.1 g/dL for urea were the best components of medium, which obtained high erythritol yield by OS-194. The optimum culture conditions were 35°C, 150 rpm and 4 d. In the above conditions, the maximum erythritol yield on fermented glucose was 29.6%. In this research, it was discovered that phosphorus was the main factor restricting the erythritol-production. When the phosphorus content in the medium was below 31.5 mg/L, the maximum yield was obtained. With the phosphorus content increasing, the erythritol-production decreased, but the production of the ethanol and the biomass increased apparently. Meanwhile, fructose, sucrose and mannose can also be utilized to produce erythritol by this strain.

Key words: osmophilic yeast; erythritol; affected factors

赤藓糖醇在自然界分布广泛, 微生物、地衣类植物、瓜果、发酵食品、酒类以及动物的体液中都可发现它的踪迹, 含量为每升几十毫克到几十克不等. 作为 21 世纪功能性食品甜味剂的赤藓糖醇, 具有降低热值显著和副作用小的特点^[1], 在当今多元

醇甜味剂应用领域有着诱人的开发前景. 赤藓糖醇的工业化生产采用酵母耗氧发酵法进行, 但由于菌种和发酵条件等因素的影响, 其产量长期未能得到显著的提高.

Spencer 和 Sallans^[2]在研究耐高渗酵母产多元

收稿日期 2000-10-13, 修订日期 2001-01-09.

作者简介: 范光先 (1968-) 男, 贵州毕节人, 硕士研究生.

万方数据

醇时发现:多元醇的产量受氮源和通风量的影响,增加培养基酵母膏的质量分数可加快耗糖速率,提高甘油产量,增大通风量可减少酒精的生成并提高甘油产量,在减少酵母膏质量分数的情况下用尿素作补充氮源也可得到最大产量的甘油. Peterson^[3]等人证实了以上观点,同时提出:1)酵母要充分但有一定限度的生长;2)通风量要充足但不过大,以部分限制 NADH 的氧化,使其参与还原生成多元醇;3)限制无机磷浓度. 日本学者若生腾雄^[4]等在研究赤藓糖醇的生产方法时发现温度也是很重要的限制因素,在 30 °C 生长很好的树叶酵母赤藓糖醇的产量却低于 37 °C 培养时的产量. 为此,作者对本中心分离的 OS-194 赤藓糖醇生产菌株进行培养条件的优化组合后,其赤藓糖醇的产量有显著提高,从原来的 2.4 g/L 提高到 2.8 g/L.

1 材料与方法

1.1 菌种

菌株 OS-194 酵母:作者所在实验室自然分离得到.

1.2 试剂

甘油、D-阿拉伯醇、赤藓糖醇、葡萄糖、高碘酸钠、亚砷酸钠、硫酸、变色酸等均为分析纯.

1.3 培养基

斜面培养基(g/L):葡萄糖 200,酵母膏 10,尿素 1,琼脂 20.

发酵培养基 I(g/L):葡萄糖 100,酵母膏 5,尿素 1.

发酵培养基 X(g/L):葡萄糖 200,酵母膏 10,尿素 1.

发酵培养基 X(g/L):葡萄糖 300,酵母膏 15,尿素 1.

pH 值自然,121 °C 灭菌 15 min.

1.4 发酵方法

在发酵培养基 X(250 mL 三角瓶中装液量为 20 mL)中接一环斜面菌种,并在 30 °C、250 r/min 条件下摇瓶振荡培养 3 d. 用吸管吸 2.5 mL 种子液于装液量为 50 mL 的 500 mL 三角瓶中,各做 3 个重复,在 35 °C、250 r/min 条件下摇瓶振荡培养,每隔 24 h 取发酵液分析,直到发酵第 5 天葡萄糖被利用完为止.

1.5 分析方法

酵母细胞于 2 500 r/min 离心 10 min,去除上清液后测定其体积;残糖用 BA-40T 型生物传感分析仪(山东科学院生物所研制)进行测定;多元醇的组分用纸层析法来分析,展开剂为正丁醇:乙醇:水=95:5:18,展开时间为 12 h,赤藓糖醇的含量用高碘酸氧化法^[5]来测定;酒精的含量用气相色谱法进行测定.

2 结果与讨论

2.1 温度的影响

温度对 OS-194 菌株发酵的影响见表 1. 37 °C 这一温度对于菌体的生长明显太高,并且葡萄糖的利用少而慢. 当温度从 30 °C 上升到 35 °C 时对赤藓糖醇产量的影响很小,然而,35 °C 时葡萄糖的利用明显大于 30 °C. 因此,35 °C 是发酵最佳温度. OS-194 于 35 °C 培养 4 d 后赤藓糖醇产量明显高于 3 d,到了第 5 天其产量已趋于稳定,因此选择 4 d 作为最适发酵天数.

表 1 温度对 OS-194 菌株葡萄糖发酵的影响

Tab.1 Effect of temperature on the fermentation of glucose by OS-194

温度/°C	最终酵母体积分数/(mL/dL)	葡萄糖质量浓度(g/dL)					赤藓糖醇的耗糖转化率/%			
		0 d	2 d	3 d	4 d	5 d	2 d	3 d	4 d	5 d
30	6.0	9.9	6.6	3.4	0.5	0.1	0.0	21.2	23.8	24.0
35	5.0	9.8	4.8	2.3	0.2	0.0	21.5	22.3	25.5	24.8
37	1.6	9.8	8.8	7.6	7.0	6.8	0.0	11.7	15.6	15.6

2.2 碳源的影响

不同碳源对发酵的影响见表 2. 在不同碳源的通风发酵试验中,用葡萄糖、果糖、甘露糖和蔗糖生产赤藓糖醇可获得较好的产量,而阿拉伯糖、半乳糖和木糖的利用很慢,而且不形成赤藓糖醇;多元醇如甘油、甘露醇、山梨醇也可被菌体利用来生长. 在所有的碳源中,以甘油为底物可形成最大的生物量,麦芽糖、乳糖和赤藓糖醇却不被菌体利用. 显

然,以 D-甘露糖为碳源时赤藓糖醇的产量最高,但成本也高,因此选择葡萄糖较为现实.

2.3 酵母膏质量浓度的影响

在培养液中除葡萄糖之外的其它主要成分是酵母膏,其质量浓度范围是 0.125~1.0 g/dL,见表 3. 在低质量浓度下,菌体长势很差,糖耗也很低. 当酵母膏质量浓度为 0.125 g/dL 时,发酵 5 d 后残糖量仍高达 80%. 可是,当酵母膏质量浓度增大到 0.5

~1.0 g/dL 时,发酵 4 d 后几乎没有残糖.酵母膏的质量浓度对不同的产物形成有明显的影 响.高质量浓度的酵母膏将会导致大量的酒精合成,而低浓度时仅合成微量.因此,在适当的发酵时间内以 0.5 g/dL 的酵母膏为最佳氮源质量浓度,此时赤藓糖醇

产量最高.

2.4 尿素质量浓度的影响

尿素是培养液中除酵母膏之外的第二种氮源营养成分,不同质量浓度的尿素对发酵的影响结果见表 4.

表 2 菌株 OS-194 对不同碳源发酵的影响

Tab.2 Fermentation of various substrates(Carbon) by OS-194

碳源	质量浓度/(g/dL)	发酵时间/d	最终 pH	酵母体积分数/(mL/dL)	耗糖量/(g/100g)	赤藓糖醇的耗糖转化率/%
L-阿拉伯糖	9.8	5	5.8	3.7	18.2	0.0
D-半乳糖	9.8	5	4.8	3.7	18.3	0.0
D-葡萄糖	9.6	4	3.0	6.0	98.3	24.8
甘油	9.7	4	5.8	10.0	75.8	0.0
乳糖	9.7	4	7.3	0.3	0.0	0.0
果糖	9.8	4	2.9	6.3	99.5	23.4
麦芽糖	9.8	5	8.1	0.3	0.0	0.0
D-甘露醇	9.7	5	5.6	5.5	24.1	0.0
D-甘露糖	9.7	4	3.3	6.0	96.1	31.5
D-山梨醇	9.6	5	4.8	5.5	31.7	0.0
蔗糖	9.9	4	3.0	5.5	99.2	18.6
D-木糖	9.8	5	4.5	3.7	53.6	0.0
赤藓糖醇	9.8	5	5.0	0.4	0.0	0.0

表 3 酵母膏质量浓度对 OS-194 菌株产物合成的影响

Tab.3 Effect of yeast extract concentration upon yield of products by OS-194

酵母膏质量浓度/(g/dL)	发酵时间/d	最终 pH 值	酵母体积分数/(ml/dL)	残糖质量浓度/(g/dL)	酒精质量浓度/(g/dL)	赤藓糖醇的耗糖转化率/%	赤藓糖醇的总糖转化率/%
1.0	4	3.5	10.0	0.3	18.1	18.8	18.2
0.5	4	2.5	6.6	0.5	3.2	29.6	28.1
0.25	5	3.5	4.0	4.8	0.3	29.5	15.3
0.125	5	5.0	2.5	8.0	0.1	22.7	4.5

注:葡萄糖 10 g/dL,尿素 0.1 g/dL,35 ℃

表 4 尿素质量浓度对 OS-194 菌株发酵的影响

Tab.4 Effect of urea concentration upon fermentation with OS-194

尿素质量浓度/(g/dL)	发酵时间/d	最终 pH 值	酵母体积分数/(mL/dL)	残糖质量浓度/(g/dL)	酒精质量浓度/(g/dL)	赤藓糖醇耗糖转化率/%
0.0	4	2.9	5.0	3.8	4.4	24.3
0.0	5	2.9	5.3	1.0	4.4	24.7
0.05	5	3.2	5.5	0.2	5.5	25.6
0.10	4	3.2	5.0	0.3	5.8	28.2
0.20	4	3.8	5.5	0.4	5.4	27.5

注:葡萄糖 10 g/dL,酵母膏 0.5 g/dL,35 ℃.

在培养液中 0~0.2 g/dL 的尿素对酵母生物量的影响是很小的,而酒精和赤藓糖醇的产量却是随着尿素质量浓度的增加而升高的,因此,在培养液中添加尿素可加快发酵.如果培养液中不添加尿素,发酵 5 d 后发酵液中的残糖量还很高;当培养液中添加 0.1 g/dL 的尿素时,发酵 4 d 后葡萄糖就完全被利用.因此,在 0.5 g/dL 酵母膏的培养液中选择 0.1 g/dL 的尿素为最佳补充氮源浓度.

2.5 磷含量的影响

在发酵试验中,偶然发现由两个厂家提供的酵母膏在同一条件下对 OS-194 菌株发酵产赤藓糖醇

的量不同.其中一种不仅赤藓糖醇的产量偏低,同时还形成大量的酒精,生物量也比较大.通过分析两种酵母膏无机磷的含量证实,高产赤藓糖醇的酵母膏含无机磷为 6.3 mg/g,而另一种酵母膏中无机磷的含量却高达 17.2 mg/g.用含无机磷低的酵母膏作基础培养基,配制含不同磷质量浓度的培养基,发酵结果如表 5 所示.在添加不同质量浓度磷的培养液中,随着磷质量浓度的升高,赤藓糖醇的产量是减少的,而酒精的产量是升高的,菌体体积也有少量的增加.添加了少量磷的培养液中葡萄糖的利用率明显提高,而含磷高的培养液中磷对糖耗

的影响却不是很明显.

如果把磷对发酵的影响与酵母膏的质量浓度联系起来分析,不难发现,酵母膏对发酵的影响并

非是其初始含氮量,而是由于它的含磷量不同而引起的.

表 5 磷质量浓度对 OS-194 菌株发酵的影响

Tab.5 Effect of phosphat concentration on fermentation by OS-194

KH ₂ PO ₄ 质量浓度/(g/dL)	发酵时间/d	pH	酵母体积分数/(mL/dL)	残糖质量浓度/(g/dL)	酒精质量浓度/(g/dL)	赤藓糖醇的耗糖转化率/%
0.0	4	2.9	6.0	0.3	3.8	25.0
0.007	4	3.1	6.0	0.1	7.0	21.7
0.014	4	3.3	6.5	0.2	9.0	18.3
0.028	4	3.4	7.0	0.1	10.2	10.1
0.056	4	3.3	7.0	0.2	12.3	9.8

注:葡萄糖 10 g/dL,酵母膏 0.5 g/dL,35℃.

2.6 溶氧与糖浓度的内在联系

在发酵过程中振荡通风对提高还原产物赤藓糖醇的产量是必要的.在 3 种糖质量浓度和 3 种通风条件下确定发酵过程中最佳的溶氧条件,用装液量为 50 mL 的 500 mL 三角瓶在不同的转速下进行发酵,测定结果见表 6.在厌氧发酵中,酵母生长很慢,赤藓糖醇的耗糖转化率只有 8.1%,而酒精可达 16%.当葡萄糖的质量浓度为 10 g/dL 时,最适转

速为 150 r/min;在葡萄糖质量浓度为 20 g/dL 的培养液中,最适转速为 200 r/min;30 g/dL 的葡萄糖在 200 r/min 时的产量略高于 250 r/min.转速最高可达到 250 r/min.此时,3 种浓度的葡萄糖培养液中赤藓糖醇的产量均低于转速为 200 r/min 时的产量.所以,对于 10 g/dL 的葡萄糖培养液来说,最适转速为 150 r/min.

表 6 通风量和糖质量浓度对 OS-194 菌株赤藓糖醇产量的影响

Tab.6 Effect of aeration and sugar concentration upon yields of glycerol by OS-194

转速/(r/min)	发酵时间/d	原糖质量浓度/(g/dL)	最终 pH	酵母体积分数/(g/dL)	残糖质量浓度/(g/dL)	赤藓糖醇的耗糖转化率/%
0	5	9.6	3.8	2.5	0.2	8.1
150	4	9.8	2.7	5.0	0.5	27.3
150	5	18.6	3.2	7.0	4.7	16.8
150	7	30.0	3.5	9.2	7.2	12.0
200	4	9.7	2.6	6.0	0.2	27.8
200	5	19.2	2.5	11.0	0.5	29.1
200	7	28.1	3.0	12.0	12.1	25.6
250	4	10.0	3.4	5.7	0.2	24.9
250	5	19.5	3.1	9.0	5.0	23.2
250	7	29.3	3.4	12.0	8.8	24.2

2.7 产物与发酵时间的关系

OS-194 菌株发酵生产赤藓糖醇的结果见图 1.

在发酵过程中,赤藓糖醇的产量随着葡萄糖的利用而增加;发酵前期有酒精形成,这是由于通风发酵过程中酒精被利用或挥发掉了,其产量可忽略不计,酵母 80% 的生物量是在发酵 2 d 时形成的,随后生长减慢直到葡萄糖耗尽;培养液的 pH 随着葡萄糖的利用而持续下降,发酵结束时有轻微回升,因此 pH 值的变化可作为发酵完成的标示.

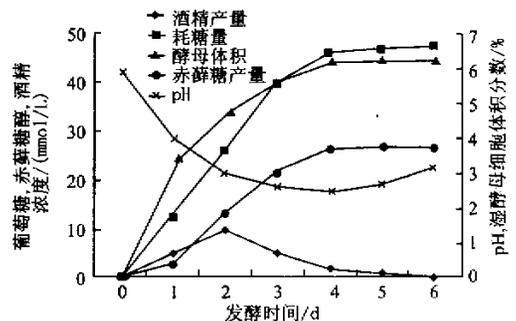


图 1 发酵时间与产物形成的关系

Fig.1 Products formed as related to time of fermentation

(上接第 136 页)

参考文献：

- [1] GOOSSENS J ,ROPER H. Erythritol :a new sweetener[J]. **Food Science and Technology Today** ,1994 (3) :144~148.
- [2] SPENCER J F T ,SALLANS H R. Production of polyol by osmophilic yeasts[J]. **Can J Microbiol** ,1956 2 :72~79.
- [3] PETERSON W H ,HENDERSHOT W T. Factors affecting production of glycerol and D-arabitol by representative yeasts of the Genus *Zygosaccharomyces*[J]. **Appl Microbiol** ,1958 6 :349~357.
- [4] 若生腾雄.ポリオール高生産性新規酵母[J]. 发酵工学 ,1988 ,6(4) 209~215.
- [5] 袁野 ,应向贤.高碘酸氧化法直接测定发酵液中赤藓糖醇[J]. 无锡轻工大学学报 ,2000 ,19(1) :72~75.