

利用酵母提高低聚果糖纯度

江波, 张涛, 王璋

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 将黑曲霉 AS 0023 生产的果糖转移酶作用于底物蔗糖, 可制备含量为 55% 的低聚果糖, 但该产品中亦含有 30% 的副产物葡萄糖。利用酵母消化低聚果糖产品中的葡萄糖, 可生产高纯度低聚果糖。将筛选得到具有较弱转化酶活性的酵母 SK 2.003, 经培养后添加于总糖浓度为 20% 的低聚果糖中, 经 30 ℃、250 r/min 反应 24 h, 制得纯度为 80.24% 的低聚果糖。

关键词: 低聚果糖; 果糖转移酶; 纯度; 酵母

中图分类号: Q 533

文献标识码: A

Increasing Purity of Fructo-oligosaccharides Mixture with Yeast

JIANG Bo, ZHANG Tao, WANG Zhang

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: A sugar mixture containing 55% fructo-oligosaccharides (FOS) could be produced with a fructosyltransferase (FTS) which was extracted from *Aspergillus niger* AS0023. However, the mixture contains 30% glucose which was an unwanted by-product. High-purity fructo-oligosaccharides can be prepared by consuming glucose with a yeast. A strain of low invertase-activity yeast, SK 2.003, was screened out and added to FOS. By incubating at 30 ℃, 250 r/min for 24 h, 80.24% of FOS was obtained.

Key words: fructooligosaccharides; fructosyltransferase; high-purity; yeast

低聚果糖 (Fructo-oligosaccharides, 简称为 FOS)^[1], 又称寡果糖、果寡糖或蔗果三糖族低聚糖, 其分子式为 $G-F_n$ (G 为葡萄糖, F 为果糖, $n=1\sim3$)。天然存在的低聚果糖主要由微生物中具有果糖基转移活性的酶作用而产生, 目前工业化生产低聚果糖的方法是将微生物中 β -呋喃果糖苷酶或果糖转移酶作用于蔗糖而获得^[2]。

已有文献报道了低聚果糖具有促进肠道健康等生理学功能, 并在食品、保健品及医药等领域得到了广泛应用^[2~4]。但由于用普通方法制备得到的

低聚果糖中含有约 30% 葡萄糖, 后者并不具备低聚果糖的生理活性, 而且它的积累抑制了转移酶反应的进行。由于高纯度低聚果糖比通常的低聚果糖混合物吸湿性低, 可用真空干燥或喷雾干燥法制成粉剂或颗粒, 因而其应用范围可进一步扩大。由此看出, 如何消除或转化产品中的副产物葡萄糖, 从而开发出低聚果糖含量达 90% 以上的低聚果糖产品, 是目前低聚果糖产业中一个亟待解决的重要课题。

分离制备高纯度低聚果糖的方法有葡萄糖氧化酶-果糖转移酶双酶法^[5]、色谱分离法^[6]、膜分

收稿日期: 2001-07-01; 修订日期: 2001-09-15。

基金项目: 国家九五科技攻关项目 (96-C03-01-01) 资助课题。

作者简介: 江波 (1962-), 男, 江苏无锡人, 工学博士, 副教授。

离法及发酵法(酵母法)^[7-8]等,利用连续色谱分离法可生产纯度高达90%以上的低聚果糖^[9],但由于设备昂贵,目前国内尚无法利用其实现低聚果糖的工业化生产.虽然也有文献报道可利用双酶法制备含量为85%的低聚果糖^[5],但该法的缺陷是酶制剂要求高,市售的商品化葡萄糖氧化酶中含有转化酶,在前者氧化产品中葡萄糖的同时,后者可降低聚果糖分解.

作者利用酵母法消除产品中的葡萄糖,从而制备出较高含量的低聚果糖.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株 8株 *Pichia* 氏酵母菌,编号为 SK 2.001至 SK 2.008,为作者实验室保藏菌种.

1.1.2 培养基

1) 斜面培养基:12 °Bx 麦芽汁,琼脂 15 g/L.

2) 基础发酵培养基(g/L):葡萄糖 30,蛋白胨 15,酵母膏 10, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2, Na_2HPO_4 2, pH 6.5.

1.1.3 普通级低聚果糖 江苏梁丰食品集团产品,低聚果糖含量为58.6%.

1.1.4 试剂 所用试剂均为化学纯以上级或生化试剂.

1.2 方法

1.2.1 酵母菌培养条件 接一环斜面种子于装有30 mL液体基础培养基的250 mL三角瓶中,于210 r/min(HYG-II型回转式恒温调速摇瓶柜,上海新屋自动化控制设备成套厂制)、30 °C条件下振荡培养72 h.

1.2.2 生物量及含水量的测定

1) 生物量测定:合并3瓶培养液于2 000 r/min下离心10 min,用蒸馏水洗涤菌体,于105 °C烘干至恒重,记录质量,即得菌体干重.

2) 含水量测定:将培养后酵母液于2 000 r/min离心10 min,取少许酵母泥于预先烘干至恒重并称重(质量 w_0)的培养皿中,称重(w_1),于105 °C烘干至恒重,记录质量(w_2).

$$\text{湿酵母含水率} = \frac{w_1 - w_2}{w_1 - w_0}$$

1.2.3 残糖的测定方法 3,5-二硝基水杨酸比色法(DNS法)^[10].

1.2.4 酵母中转化酶活性测定 称取酵母1 g于研钵,加甲苯2 mL及石英砂少许,研磨至酵母体破裂(5 min),水洗定容至10 mL并移入离心管,离心

去除甲苯,于36 °C保温15 min待用.吸取2 mL酶液至由1 mL蔗糖(浓度38%)和1 mL pH 4.6的醋酸缓冲液体系中,36 °C水浴保温10 min,加0.5 mL 1 mol/L NaOH终止反应,用DNS法测定生成的还原糖.转化酶活定义为每分钟生成1 μmol 还原糖(按葡萄糖计)为1个单位.

1.2.5 糖组分的分析 利用阿贝折光仪测定糖液中固形物含量.各组分含量按以下方法测定:HPLC为Waters209系列,配有R401示差折光检测器和M740数据处理器;色谱柱为E. Merck公司LiChrosorb 3.9 mm $\times$ 150 mm 氨基柱,填料粒度5 μm ;流动相为乙腈:水(体积比)=75:25,体积流量为1 mL/min;温度为25 °C;进样量为5 μL .样品预处理是将糖液稀释至总固形物为5%,经0.45 μm 超滤膜过滤.

1.2.6 25 L发酵罐生产酵母及高纯度低聚果糖

1) 按17 L优化培养基配方所需量,配制成13 L培养液,经灭菌后发酵液总体积为17 L,经30 °C、250 r/min、0.4 m³/h空气流量通风培养,发酵结束后收集菌体待用.

2) 配制17 L总糖为20%的普通级低聚果糖于25 L发酵罐中,按2 g/g总糖加入酵母菌体,经30 °C、250 r/min、0.3 m³/h通风培养30 h,用HPLC分析最终产品组成.

2 结果与讨论

2.1 低转化酶活性酵母的筛选

酵母通常都含有一定量的转化酶活性,它可将蔗糖水解为葡萄糖和果糖.但是,由于低聚果糖也可被转化酶作用,因而筛选出低转化酶活性的酵母是本研究的关键之一.

分别对8株现有保藏酵母测定其转化酶活性,结果见表1.

表1 保藏酵母转化酶活性

酵母编号	转化酶活/(U/mL 发酵液)
SK2.001	0.0901
SK2.002	0.0781
SK2.003	0.0305
SK2.004	0.0570
SK2.005	0.0297
SK2.006	0.1174
SK2.007	0.3811
SK2.008	0.3164

结果表明,SK2.003及SK2.005的转化酶活性

较低。

将总糖浓度为71.4%、低聚果糖含量为58%的起始糖液稀释至总固形物为20%，取25 mL加入250 mL三角瓶中，分别加入1 g SK2.003及SK2.005湿酵母，然后于30℃，210 r/min下摇瓶反应8 h，利用HPLC测定产物中各组成的含量。

表2 经酵母处理后糖液组成

样品	葡萄糖	蔗糖	蔗果三糖	蔗果四糖	蔗果五糖	总低聚果糖
原始样	27.92	12.50	36.46	20.83	2.29	58.58
SK2.003	18.11	14.70	39.87	23.47	3.85	67.19
SK2.005	20.81	15.80	38.30	22.33	2.76	63.39

注：总低聚果糖为蔗果三糖、蔗果四糖及蔗果五糖之和。

由表1、2可以看出，SK2.003转化酶活按发酵液计比SK2.005高，但去除葡萄糖效果较SK2.005优，因而，在以后试验中采用SK2.003作为实验菌种。

2.2 SK2.003 培养条件的优化

由于酵母不分泌蛋白酶，不能代谢细胞外蛋白质，但能利用氨和尿素作为氮源，也可利用氨基酸、肽等作为氮源^[11]。然而这些氮源的利用因酵母的种属不同而异^[12]，实验确定该酵母的培养采用尿素和蛋白胨结合作为氮源。由于蔗糖可诱导转化酶的产生，为避免蔗糖的诱导效应，采用葡萄糖为单一碳源，并利用酵母膏作为生长因子。

采用 $L_9(3^4)$ 正交表对基础培养基中的碳源和氮源浓度、酵母膏含量及通风量(以不同的装液量方式)进行优化试验，以确定较适的酵母培养条件，结果见表3、4。

表3 各因素的水平

Tab.3 Factor levels

因素水平	A 葡萄糖 含量/(g/L)	B 氮源/ (g/L)	C 酵母膏/ (g/L)	D 装液量/ mL
1	60	蛋白胨 5 尿素 1.3	6	30
2	50	蛋白胨 7.5 尿素 2	2.5	40
3	40	蛋白胨 10 尿素 2.7	10	20

表4 试验方案和试验结果

Tab.4 Experiment plans and results

试验	A	B	C	D	生物量/(g/L)
1	1	1	1	1	12.86
2	1	2	2	2	11.19
3	1	3	3	3	14.14
4	2	1	2	3	10.36
5	2	2	3	1	12.38
6	2	3	1	2	11.19
7	3	1	3	2	10.67
8	3	2	1	3	10.26
9	3	3	2	1	9.27

为了直观起见，作出因素和试验指标的关系图，见图1。

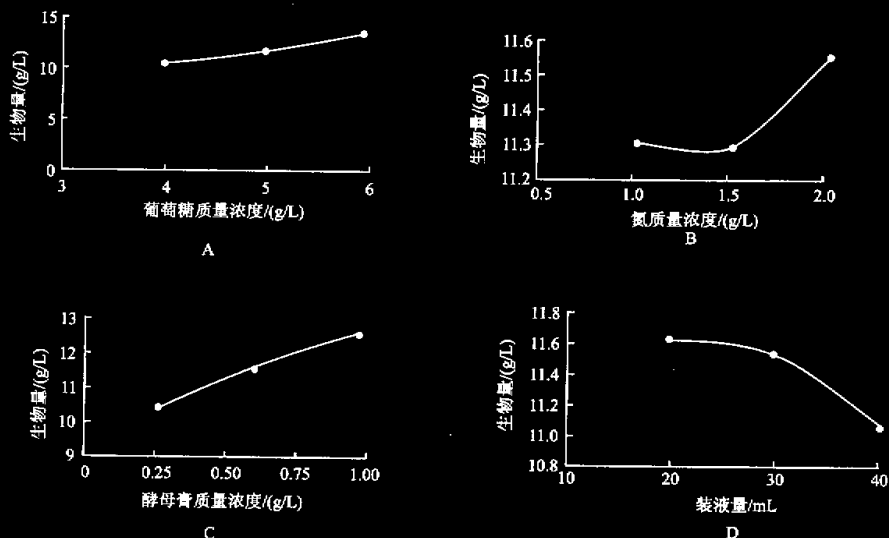


图1 指标和因素关系图

Fig.1 The relationship of indexes and factors

按极差大小决定因素的主次顺序为: $A \rightarrow C \rightarrow D \rightarrow B$; 而较优的工艺条件为: $A_1 B_3 C_3 D_3$ 。

上述试验结果表明, 在实验范围内, 碳源对菌体生长最为敏感, 酵母膏含量其次, 氮源含量及通气量不是影响酵母生长的主要因素。因此, 最终选取培养基配方为葡萄糖 6%, 氮源含量 1.5%, 酵母膏 1.0%, 装液量 30 mL。

2.3 摇瓶条件制备高纯度低聚果糖

将总糖为 71.4% 的低聚果糖稀释至 20%, 分装于 250 mL 三角瓶中, 每瓶装 25 mL, 按 2 g/g 总糖添加酵母于 25 mL 糖液中, 于 30 °C, 210 r/min 摇瓶中反应 24 h, 再于 3 000 r/min 下离心 15 min, 取上清糖液用 HPLC 分析其糖液组成, 结果见表 5。

表 5 低聚果糖各组分含量(干基)

Tab.5 Fos contents (dry base)

组 分	含量/%
葡萄糖	4.00
蔗糖	15.76
蔗果三糖	43.90
蔗果四糖	31.22
蔗果五糖	5.12
总低聚果糖	80.24

2.4 25 L 发酵罐生产酵母及高纯度低聚果糖

按 2.2 中获得的最佳配方配制培养基, 经蒸气灭菌, 无菌接入酵母种子, 通风培养并定时取样分析, 结果见图 2。

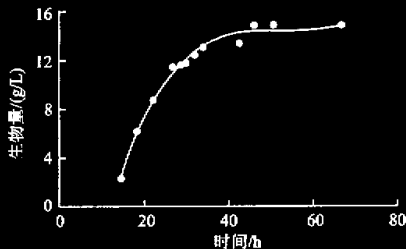


图 2 酵母生长曲线

Fig.2 The growth profile of yeast

结果表明, 当培养至 15 h 时, 酵母生长缓慢, 15 h 后生长速度加快, 50 h 后生物量保持稳定。收集菌体, 得 560 g 酵母体, 然后按 1.2.6 的方法加入低聚果糖, 转化后产物组分见表 6。

表 6 25 L 罐生产低聚果糖组分含量(干基)

Tab.6 FOS content after incubation in 25 L tank (dry base)

组 分	含量/%
葡萄糖	1.03
蔗糖	18.80
蔗果三糖	47.73
蔗果四糖	28.55
蔗果五糖	3.90
总低聚果糖	80.17

25 L 发酵罐结果表明, 可利用酵母基本消除葡萄糖, 而体系中的功效成分低聚果糖则未受到酵母利用或酵母中转化酶的破坏, 其含量可达到 80%。由此可见, 利用酵母法去除葡萄糖从而制备高纯度低聚果糖在工业上完全可行。值得注意的是, 酵母菌在低浓度葡萄糖中进行好氧生长时, 可将葡萄糖分解为二氧化碳和水, 即巴斯德效应; 另一个影响酵母呼吸能力的现象是“葡萄糖效应”, 即酵母菌在中等浓度的葡萄糖液(5%)中显示厌氧发酵, 即使对培养基通气也不能使其进行呼吸活动, 若葡萄糖浓度降低, 则呼吸作用增强^[11,13]。其原因是, 当存在高浓度葡萄糖时, 呼吸酶的合成受碳源分解物的抑制, 即降解物阻遏。因而可考虑在酵母菌培养时, 采用流加方式。在利用酵母代谢葡萄糖时, 酵母产生的代谢副产物如微量的醇、醛, 可能对低聚果糖产品的风味产生不良影响, 需在反应后采用脱味措施。尽管利用本法可制备得到 80% 的低聚果糖, 但若制备更高纯度产品, 仍应与其它分离纯化手段相结合, 以制备纯度高于 90% 的高纯度产品。

参考文献:

- [1] 吴东儒主编. 糖类的生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1987.
- [2] HIDAKA H. Fructooligosaccharides, a newly developed food material for health[J]. *Kagaku to Seibutsu*, 1983, 21:291~293.
- [3] 日高秀昌, 荣田利章. 利用糖转移反应制备低聚糖[J]. *Bio Industry*, 1984, 1:5~13.

(上接第 448 页)

- [4] SPIEGEL J E, ROSE R, KARABELL P, *et al.* Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients[J]. *Food Technol*, 1994, (1):85~89.
- [5] L'HOCINE L, 江波, 王璋. 双酶法生产高纯度低聚果糖研究[J]. *食品科学*, 1997, 18(9):24~27.
- [6] MIYAKE T, SAKEI S, SHIBUYA T. Process for producing high-purity oligoglucosylfructosides[P]. GB 2156820, 1985-01-23.
- [7] 上野秀雄, 筱原智. 精制低聚糖的制造方法[P]. JP 07-31492, 1995-02-03.
- [8] ODA Y, OUCHI K. Construction of a sucrose-fermenting bakers' yeast incapable of hydrolysing fructooligosaccharides[J]. *Enzyme Microb Technol*, 1991, 13:495~498.
- [9] 江波, 唐琳, 王璋等. 高纯度低聚果糖的研制[J]. *中国食品添加剂*, 1999, (3): 1~6.
- [10] 北京大学生物化学教研室编. 生物化学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 1979.
- [11] D. R. 贝里著, 楼纯菊, 徐士菊译, 酵母菌生物学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1986.
- [12] 诸葛健, 王正祥著. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994.
- [13] H. J. 法夫, M. W. 米勒, E. M. 酵母菌的生活[M]. 贵阳: 酿酒科技编辑部, 1984.

(责任编辑: 李春丽)