

pH 及通气量对法夫酵母生物量以及所产⁶G-果糖基转移酶活性的影响

林同柱, 宁亚维, 杨 娜, 王金鹏, 徐学明*
(江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

摘 要: 实验分别考察了 5L 发酵罐中恒定 pH7.0、8.0、9.0 和发酵前期每隔 4h、发酵后期每隔 12h 改变 pH 的梯度控制方法以及不同通气量对法夫酵母发酵过程中生物量以及所产⁶G-果糖基转移酶活性的影响, 结果表明, 恒定的 pH7.0 和通气量 5L/min 最有利于细胞生长, 得到最大生物量(干重)分别为 11.6 和 11.8g/L。恒定的 pH8.0 和通气量 8L/min 最有利于酶活性, 得到最高酶活性都为 0.32mol/L/min, 综合考虑生物量以及酶活性, 最终确定优化后的发酵条件是控制发酵过程 pH 为 8.0, 通气量为 8L/min, 发酵以后在 72h 得到最大生物量为 11.20g/L, 最高酶活为 0.32mol/L/min。
关键词: 法夫酵母, pH 控制, 通气量, ⁶G-果糖基转移酶

Effect of pH and ventilatory capacity control strategies on biomass and ⁶G-fructofuranosidase activity of *Xanthophyllomyces dendrorhous* in the fermentor

LIN Tong-zhu, NING Ya-wei, YANG Na, WANG Jin-peng, XU Xue-ming*
(Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The effect of initial culture pH and controlled pH ranging from 7.0 to 9.0 and VC (ventilatory capacity) ranging from 5 to 12L/min on biomass and ⁶G-fructofuranosidase activity by *Xanthophyllomyces dendrorhous* which were using in the free-whole-cell biotransformation were investigated in batch fermentation. An optimal pH of 7.0 and VC of 5L/min were obtained for cell growth, cell density was 11.6g/L and 11.8g/L, respectively, and an optimal pH of 8.0 and VC of 8L/min were obtained for ⁶G-fructofuranosidase activity, both of them were 0.32mol/L/min. Comprehensive consideration of the cell density and ⁶G-fructofuranosidase activity, the final optimal pH and VC for fermentation was 8.0 and 8L/min, respectively.

Key words: *Xanthophyllomyces dendrorhous*; pH; VC; ⁶G-fructofuranosidase

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)11-0128-04

新科斯糖是由一个果糖基与蔗糖分子中的葡萄糖基 6 碳位相连接而成的一种⁶G 型蔗果三糖族低聚糖。它不但具有普通低聚糖的生理功能特性, 如调节肠道菌群平衡、降血脂、降血压等生理功能^[1], 而且还具有比一般低聚糖更为优越的增殖双歧杆菌的能力^[2]。通常新科斯糖不仅存在于龙舌兰属、紫苑科、风铃草科、百合目等植物中^[3], 同时也是微生物中的具有果糖基转移酶活性的酶作用时的微小产物^[4]。据报道目前工业上主要利用黑曲霉^[5]、青霉^[6]、运动单胞菌^[7]、乳杆菌^[8]来生产低聚糖, 但是⁶G 型低聚果糖的生产则主要是通过法夫酵母发酵而得。有报道

证明在底物为蔗糖的培养基中, 新科斯糖是法夫酵母代谢过程中的主要产物^[9]。目前国内外对法夫酵母的研究多集中在利用其发酵生产虾青素上面, 对于利用法夫酵母发酵生产新科斯糖的研究较少^[10-11]。本实验室自 2005 年起在原研究法夫酵母产虾青素的基础上开始从事发酵生产新科斯糖的研究, 分别就法夫酵母所产新科斯糖的结构以及发酵工艺进行了鉴定^[12]和研究^[10-11], 并且对法夫酵母所产的⁶G-果糖基转移酶进行了一些性质及纯化方面的研究^[13], 证明全细胞生物转化是工业化生产新科斯糖的最有效方法, 并获得相关发明专利 1 项^[14]。全细胞生物转化法的关键在于高密度的细胞以及高的⁶G-果糖基转移酶的酶活, 宁亚维的研究^[15]已经获得很高⁶G-果糖基转移酶酶活, 但是目前的研究多集中在摇瓶发酵中, 对在发酵罐中的研究却尚属空白。本论文旨在探索不同的 pH 和通气量的控制方法对发酵过程法夫酵母生物量及其⁶G-果糖基转移酶的酶活影响, 期望为法夫酵母工业化生产新科斯糖提供

收稿日期: 2012-11-12 * 通讯联系人

作者简介: 林同柱(1988-), 男, 在读硕士, 研究方向: 法夫酵母发酵生产新科斯糖中试。

基金项目: 江苏省无锡市第十五批科技计划项目(333 工程)(CAE01001-07); 江南大学博士研究生科学研究基金(JUDCF10050)。

参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

法夫酵母 269、新科斯糖标准品^[11] 本实验室选育^[16];斜面培养基:10g/L 蔗糖,5g/L 蛋白胨,3g/L 酵母膏,20g/L 琼脂粉;种子培养基:30g/L 蔗糖,5g/L 蛋白胨,3g/L 酵母膏;发酵培养基:30g/L 蔗糖,45mL/L 玉米浆;蔗糖、蛋白胨、酵母膏、琼脂粉等均为国产分析纯;玉米浆 上海西王淀粉糖有限公司提供,含氮量在 4.5% 左右。

BIOSTAT Aplus 5L 全自动发酵罐 德国 Sartorius 公司;FLY2102C 型摇床 上海申贤恒温设备厂;RJ-TDL-40C 型离心机 无锡市瑞江分析仪器有限公司;LC-20A 岛津液相色谱工作站 日本岛津。

1.2 培养条件及方法

1.2.1 种子培养方法 从斜面上挑去两环菌种接种于 30mL 种子培养基的 250mL 锥形瓶中,然后将其放入 20℃,220r/min 的摇床中震荡培养 36h。

1.2.2 发酵培养方法 将培养好的种子液以 10% 的接种量接入 5L 发酵罐装的 3L 发酵培养基中,在 20℃,转速为 300~400r/min,通气量为 5~12L/min 的条件下发酵培养,发酵 pH 用 3mol/L 氢氧化钠溶液以及 2mol/L 盐酸溶液调节。

1.3 分析方法

1.3.1 生物量的测定方法 干重法^[17]。

1.3.2 酶活的测定方法 取 20mL 的发酵液离心并收集湿菌体和上清液,湿菌体用蒸馏水洗涤 2~3 次,然后加入 10mL 400g/L 的蔗糖溶液,在 30℃,220r/min 条件下培养 90min,离心并在 85℃ 的热水浴中放置 7~8min 灭酶,冷却后取上清液用 0.4μm 微孔过滤,滤液用 1.3.4 所示的液相色谱法进行分析,利用蔗糖定量,通过峰面积归一法得到新科斯糖含量。

酶活(mol/L/min) = 新科斯糖含量(g)/新科斯糖摩尔质量(g/mol)/所需发酵液体积(0.02L)/转化时间(90min)

1.3.3 残糖量的测定方法 收集发酵液离心过上清液,然后经 0.4μm 微孔过滤,滤液用 1.3.4 所示的液相色谱法进行分析,利用蔗糖标准品进行定量。

1.3.4 液相色谱条件 工作站:岛津 LC-20A,色谱柱:Sugarpak,6.5 × 300mm,流动相:纯水,检测器:示差折光检测器,流速 0.3mL/min,进样体积 20mL,定量:蔗糖溶液对照。

2 结果与讨论

2.1 不同恒定 pH 对法夫酵母发酵过程中生物量的影响

有文献^[9,11]报道,在摇瓶中进行法夫酵母发酵时,初始 pH 对法夫酵母发酵过程的影响很大,其最适 pH 接近中性,在 pH 为 6~8 的范围内法夫酵母发酵生产新科斯糖的产量均较高,故设计实验如下:在起始培养基 pH 为 8.0 以及控制恒定的 pH7.0~9.0 的条件下在 5L 发酵罐中分别对法夫酵母进行分批发酵,发酵过程中生物量随时间变化趋势如图 1 所示。

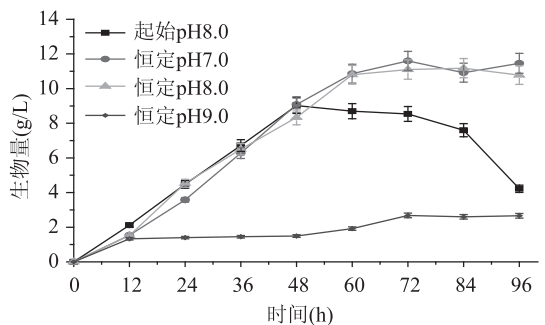


图1 不同恒定 pH 对法夫酵母发酵过程中生物量的影响

Fig.1 The effect of initial culture pH on biomass by *Xanthophyllomyces dendrorhous* in batch fermentation

由图 1 可知,控制恒定的 pH7.0 得到最大生物量 11.6g/L,比不控制 pH 时提高了 24%,控制恒定 pH8.0 次之,最大生物量为 11.18g/L,但是两者相差不大,当控制恒定的 pH 为 9.0 的时候,由于 pH 过高,明显的抑制了细胞的生长。在初始 pH8.0 自然发酵过程中,pH 呈现先下降后上升的趋势,pH 最低降到 5.06,此时达到最大生物量为 9.02g/L。同时,控制恒定的 pH 以后,酵母对数生长期的时间由原来的 48h 延长至 72h,有效地提高了生物量。由此可知,控制恒定的 pH 有利于细胞的生长,其最适 pH 接近中性,与文献报道一致^[9,11]。

2.2 不同恒定的 pH 对法夫酵母发酵过程中⁶G-果糖基转移酶活性的影响

由图 1、图 2 可以看出,⁶G-果糖基转移酶的产生是同细胞的生长几乎是同时进行的。控制恒定的 pH8.0 最有利于⁶G-果糖基转移酶的活性,其最高酶活是不控制 pH 时的 2.67 倍,达到了 0.32mol/L/min,其次是起始 pH8.0 的自然发酵过程。恒定 pH7.0 和 9.0 都没有显著地提高酵母细胞所产⁶G-果糖基转移酶的活性,即过高或者过低的 pH 都不利于⁶G-果糖基转移酶的活性。同时可以看出恒定 pH8.0 时达到最大酶活的时间延长至 72h,比自然发酵过程延长了 12h,比恒定 pH7.0 时延长了 24h,虽然发酵效率有所降低,但是酶活却提高近 2 倍。综上所述,控制恒定的 pH8.0 最有利于⁶G-果糖基转移酶的活性。

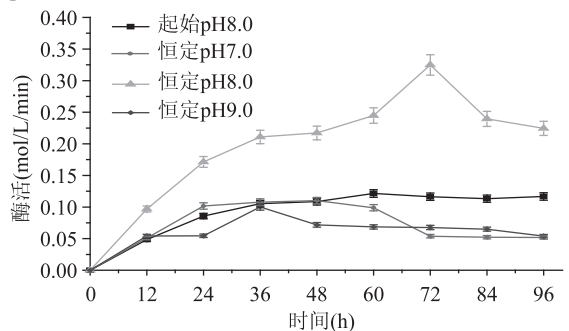


图2 不同恒定 pH 对法夫酵母发酵过程中⁶G-果糖基转移酶活性的影响

Fig.2 The effect of initial culture pH on ⁶G-fructofuranosidase activity by *Xanthophyllomyces dendrorhous* in batch fermentation

2.3 梯形控制 pH 对酵母发酵过程的影响

有文献报道^[18-19]利用周期性控制 pH 的方法来优化微生物的发酵过程,此方法的关键在于 pH 需对细胞发酵过程中的生物量以及所产酶的酶活都有显著地影响,由上述的讨论可知,在法夫酵母发酵的过程中,pH 是一个很重要的影响因素,所以尝试通过周期性的改变 pH 来刺激发酵过程中细胞所产酶的酶活以及生物量,如图 3 所示,在细胞生长前期每隔 4h 改变一次 pH,然后每隔 12h 改变一次 pH,结果如图 4 所示,可以发现这种频繁改变 pH 的方法可以很好的刺激细胞生长,使其生物量达到了 13.46g/L,比未控制 pH 增长了 49.22%,比 pH 为 7.0 时增长了 16.03%,说明这种方式对细胞的生长很显著,但是通过比较酶活我们可以发现,其最大酶活比之前恒定 pH 发酵有所降低,这说明了 pH 对法夫酵母所产⁶G-果糖基转移酶的活性有着很显著的影响,不稳定的发酵环境有可能会钝化酶的活性。

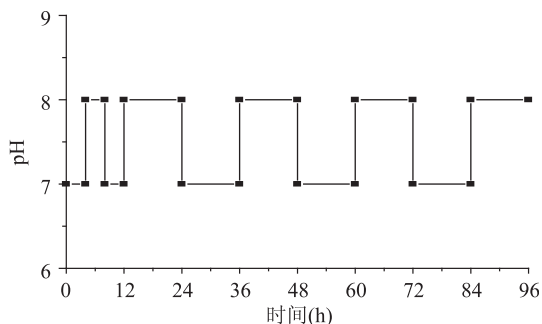


图3 pH 梯形控制方法

Fig.3 pH step control method

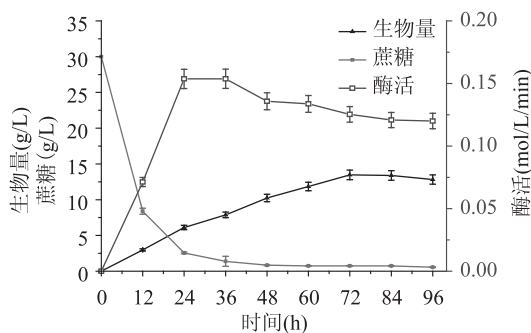


图4 梯形控制 pH 对法夫酵母发酵过程的影响

Fig.4 Batch fermentation with culture pH

2.4 不同通气量对法夫酵母发酵过程中生物量的影响

在发酵过程中控制恒定的 pH 为 8.0,通气量分别为 5、8、12L/min,法夫酵母细胞生物量以及酶活随发酵时间变化的曲线图 5 所示。不同的通气量导致发酵液中溶解氧的不同,而法夫酵母的发酵是一种好氧型的发酵,发酵过程中酵母细胞的摄氧率直接影响细胞的生长以及新陈代谢过程。由图 5 可以看出,随着通气量的不断升高,发酵所得最大生物量逐渐减少,通气量为 5L/min 时得到最大生物量为 11.8g/L,其次是通气量 8L/min,为 11.2g/L,通气量为 12L/min 最少,为 9.6g/L,所用时间都为 72h。

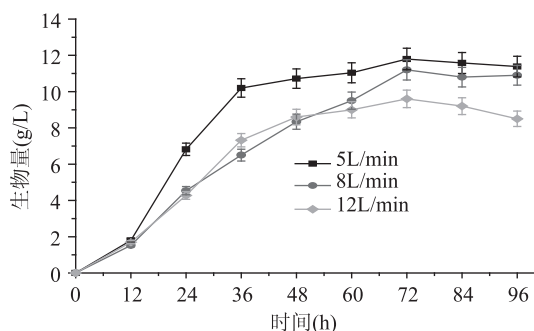


图5 不同通气量对法夫酵母发酵过程中生物量的影响

Fig.5 The effect of different V_c on biomass by

Xanthophyllomyces dendrorhous in batch fermentation

2.5 不同通气量对法夫酵母发酵过程中⁶G-果糖基转移酶酶活性的影响

根据之前的文献报道^[10],通气量少对菌丝生长有利,但是对产酶不利,提高通气量有利于酶活却不利于细胞的生长,通过图 6 可以看出,在法夫酵母的发酵过程中,随着通气量的增加,最大酶活呈现先增加后降低的趋势,过高或者过低的通气量都不利于酶的活性的提高。通气量为 8L/min 时得到最高酶活为 0.32mol/L/min,所用时间为 72h;其次是通气量为 5L/min 时最高酶活为 0.26mol/L/min,所用时间为 48h;通气量为 12L/min 时,酶活最低为 0.20mol/L/min,所用时间为 84h。所以控制恒定的通气量 8L/min 最有利于法夫酵母发酵所产⁶G-果糖基转移酶的活性。

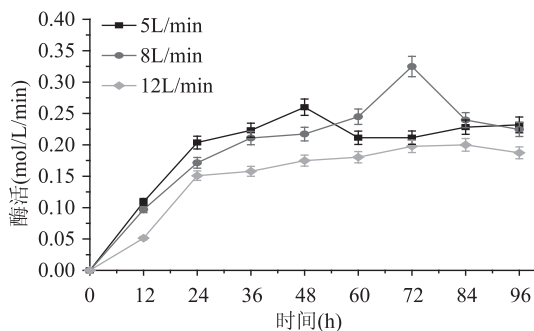


图6 不同通气量对法夫酵母发酵过程中

⁶G-果糖基转移酶酶活性的影响

Fig.6 The effect of different V_c on on

⁶G-fructofuranosidase activity by

Xanthophyllomyces dendrorhous in batch fermentation

3 结论

通过上述研究可以发现,法夫酵母细胞的生长以及所产⁶G-果糖基转移酶的活性都要受到发酵过程中 pH 以及通气量的影响,控制通气量以及恒定的 pH 以后能够有效地提高酶活以及生物量,稳定的发酵环境更有利于法夫酵母所产⁶G-果糖基转移酶的活性,综合考虑生物量以及酶活,最终优化后的 pH 以及通气量分别为 8.0、8L/min。

参考文献

- [1] 郑建仙. 功能性低聚糖[M]. 北京: 化工工业出版社, 2004: 1-6.

黄真菌菌株分子鉴定[J].食品科学,2010,31(9):182-186.

- [16] Bogomolova T S, PITSIK E V, Mikhaylova Y V, *et al.* Molecular identification of *Malassezia* species by rDNA sequencing[J]. *Mycoses*, 2011, 54 (2) :129–130.
- [17] Aditya K G, Teun B, Bart T, *et al.* Identification and Typing of *Malassezia* Species by Amplified Fragment Length Polymorphism and Sequence Analyses of the Internal Transcribed Spacer and Large–Subunit Regions of Ribosomal DNA[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42 (9) :4253–4260.
- [18] Ahmed M, Singh M, Bera A, *et al.* Molecular basis for identification of species/isolates of gastrointestinal nematode parasites[J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2011, 4 (8) :589–593.
- [19] János V, Beàta T, Krisztina R, *et al.* Phylogenetic analysis of *Aspergillus* section *Circumdato* based on sequences of the internal transcribed spacer regions and the 5.8S rRNA gene[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2000, 30 (1) :71–80.
- [20] Chen Y Q, Wang N, Qu L H, *et al.* Determination of the anamorph of *Cordyceps sinensis* inferred from the analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacers and 5.8S rDNA[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2001, 29 (6) :597–607.
- [21] Chen X Y, Qi Y D, Wei J H, *et al.* Molecular identification of endophytic fungi from medicinal plant *Huperzia serrata* based on rDNA ITS analysis [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2011, 27 (3) :495–503.

- Transportlimited sucrose utilization and neokestose production by *Phaffia rhodozyma* [J]. *Biotechnology Letters*, 1996, 18: 975-980.
- [10] 张静娟. 法夫酵母发酵生产新科斯糖 [D]. 无锡: 江南大学食品学院, 2007.
- [11] 宁亚维, 张静娟, 苏丁, 等. 法夫酵母生产新科斯糖的发酵条件 [J]. *食品与生物技术学报*, 2010, 29(3): 458-463.
- [12] 苏丁, 陈晓明, 徐学明. 法夫酵母低聚糖结构分析的研究 [J]. *食品与生物技术学报*, 2009, 28(2): 197-200.
- [13] Jing Chen, Xiaoming Chen, Xueming Xu, *et al.* Biochemical characterization of a *Xanthophyllomyces dendrorhous* intracellular 6G-fructofuranosidase and its use in production of neo-fructooligosaccharides [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102: 1715-1721.
- [14] 徐学明, 张静娟, 金征宇. 一种低聚糖-新科斯糖的发酵法生产方法 [P]. 中国专利: CN100392091C, 2008-06-04.
- [15] NING Yawei, WAN Jinpeng, CHEN Jing. Production of neo-fructooligosaccharides using free-whole-cell biotransformation by *Xanthophyllomyces dendrorhous* [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(19): 7472-7478.
- [16] 徐学明, 金征宇, 吕玉华. 虾青素高产突变株的选育 [J]. *食品与发酵工业*, 2000, 26(5): 22-27.
- [17] 徐学明, 金征宇, 刘当慧. 法夫酵母产虾青素的摇瓶工艺 [J]. *无锡轻工大学学报*, 2000, 19(3): 230-235.
- [18] 纪晓俊, 黄和, 朱建国, 等. 1,3-丙二醇发酵过程中 pH 调控策略研究 [J]. *武汉理工大学学报*, 2007, 29(3): 75-78.
- [19] 刘亚丽, 贾士儒, 谭之磊, 等. pH 调控和蔗糖流加控制对乳酸链球菌素发酵的影响 [J]. *天津科技大学学报*, 2008, 23(3): 5-7.

- [22] Hansen F, Wischnewski N, Moreth U, *et al.* Molecular Identification of *Fitzroya Cupressoides*, *Sequoia Sempervirens*, and *Thuja Plicata* Wood Using Taxon-specific rDNA-ITS Primers [J]. *Iawa Journal*, 2011, 32(2): 273-284.
- [23] Hesham A E-L, Mohamed H M. Molecular Genetic Identification of Yeast Strains Isolated from Egyptian Soils for Solubilization of Inorganic Phosphates and Growth Promotion of Corn Plants [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, 21(1): 55-61.
- [24] Merritt S, David E, Wilford M H, *et al.* An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucriphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds [J]. *Plant Science*, 2003, 165(4): 913-922.
- [25] 中华人民共和国国家标准. 白酒分析方法 [S]. GB/T 10345-2007.
- [26] 刘艳梅, 朱建兰, 杨航宇. 曲霉基因组 DNA 提取方法研究 [J]. *西北农业学报*, 2009, 18(2): 55-58.
- [27] 全国信息与文献标准化技术委员会出版物格式分技术委员会. 设计与印刷国家标准色谱 [M]. 辽宁: 辽宁科学技术出版社, 2009: 2-50.
- [28] Renske L, Paula L, Thomw K, *et al.* Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(1): 327-333.
- [29] 李忠庆, 郭芳. 红曲菌的形态与分类学 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2003: 1-65.