

文章编号 :1009-038X(2000)03-0205-04

产甘油假丝酵母在丙三醇发酵过程中 的有机酸种类及其变化*

金海如, 诸葛健

(无锡轻工大学生物工程学院, 江苏无锡 214036)

摘 要: HPLC 分析研究了产甘油假丝酵母(*Candida glycerolgenesis*) 发酵过程中有机酸的种类和含量变化. *C. glycerolgenesis* 主要在菌体生长期产生有机酸, 使发酵液总酸增加. 确定了发酵过程形成的有机酸含有乙酸、乳酸、丙酮酸、酮戊二酸、苹果酸等. 建立了 HPLC 测定有机酸的方法. 分析发现: 有机酸中乙酸质量浓度最高约为 1.6 g/L. 随着发酵时间的延长, 发酵液总酸含量逐渐下降, 而乙酸和 α -酮戊二酸在发酵后期有所回升.

关键词: 高效液相色谱; 产甘油假丝酵母; 有机酸; 丙三醇

中图分类号: TQ223.163

文献标识码: A

Kinds and Amount Variation of Organic Acids During Microbial Glycerol Production with *C. glycerolgenesis*

JIN Hai-ru, ZHUGE Jian

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

Abstract: The kinds and amount of organic acids during microbial glycerol production with *C. glycerolgenesis* were determined by HPLC. The organic acids were mainly produced in growth phase in *C. glycerolgenesis* which increased the total acidity of fermentation medium. There were acetic acid, lactate, pyruvate, malic acid, α -ketoglutaric determined by HPLC during fermentation process. It was found that acetic acid was the highest, about 1.6 g/L. After the growth phase the total acidity of fermentation medium decreased. However, the amount of acetic acid and α -ketoglutaric acid increased slightly.

Key words: HPLC; *Candida glycerolgenesis*; organic acids; glycerol

微生物发酵过程中有机酸的形成是细胞代谢活动的结果, 如啤酒、葡萄酒、醋等发酵产品中皆含有有机酸, 有机酸的存在增添了产品的风味, 但在其它发酵产品如丙三醇中, 有机酸的存在就影响了产品的提取和产品的质量. 产甘油假丝酵母 *Candida glycerolgenesis* 是生产丙三醇的优良菌株^[1,2], 已成功地用于工业化生产. 但发酵过程有机酸的形

在丙三醇生产中是不利的, 一方面导致耗糖转化率的下降, 另一方面对丙三醇的后提取及成品质量也有较大的影响. 因为丙三醇产品中含量较高的脂肪酸及脂肪酸酯与发酵过程形成的有机酸具有相应关系. 所以, 在微生物发酵过程中鉴定和确认有机酸对产品质量的控制有其重要意义. 此外, 研究微生物产生的有机酸种类可以确定其代谢途径; 也有

* 收稿日期: 1999-09-15 修订日期: 2000-03-06.

基金项目: 国家“九五”科技攻关项目资助课题(96-C03-03-03).

作者简介: 金海如(1970年2月生), 男, 浙江东阳人, 发酵工程博士研究生.

通过分析酵母代谢产生有机酸的种类和数量来进行菌种鉴定^[1]。

测定发酵产品中有有机酸的方法包括薄层层析法(TLC)、酶法、分光光度法、气固或气液色谱法(GSC 或 GLC)以及高效液相色谱法(HPLC)^[3~7],其中气相和液相色谱法是目前最精确和直接的方法。微生物发酵产生的非挥发性酸一般可用气相色谱分析,但如果一个样品同时含有挥发性和非挥发性酸,则用 HPLC 较为适宜,特别是三羧酸等不易衍生化的有机酸。强酸性离子交换、离子排斥和分配树脂在最适的酸性流动相中可以较好地分离发酵产物,作者采用磺化聚苯乙烯-二乙烯苯树脂柱的阴离子排斥机制分离三羧酸循环的有机酸和其它有机酸。

目前,在微生物生产丙三醇过程中产生有机酸的种类及有机酸对产品质量的影响,国内外尚未见报道。确定发酵过程产生的有机酸种类及其含量不仅有助于了解丙三醇发酵的代谢背景,也有利于进一步代谢控制某些有机酸的产生,提高丙三醇的产率和质量。作者确定了发酵过程产生的有机酸种类、有机酸的测定方法及总酸、有机酸含量的变化趋势。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 *C. glycerolgenesis* 无锡轻工大学发酵甘油研究设计中心提供。

1.1.2 种子培养基(g/dL) 葡萄糖 10,玉米浆 1,尿素 0.2。

1.1.3 发酵培养基(g/dL) 葡萄糖 25,玉米浆 0.2~0.8,尿素 0.2。

1.1.4 高效液相色谱 Alltech 426 HPLC pump, ChromTek™ 色谱数据系统(American Sage Inc.), Linear™ UVIS 200 检测器;Alltech IC Wescan Anion Exclusion Column 300 mm×7.8 mm 柱子;Particle Size 10 μm,0.22 μm 微孔滤膜和 0.45 μm 混合纤维素酯微孔膜(上海半岛实业有限公司净化器材厂生产)。

1.1.5 有机酸标准液 标准有机酸溶液采用超纯水配制,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后备用。标准有机酸 苹果酸、乳酸、乙酸、酮戊二酸及丙酮酸(分析纯) 超纯水 无锡华晶电子集团公司。

1.2 方法

1.2.1 培养条件 HYG-II 回转式恒温摇瓶柜,发酵温度 30℃,转速 250 r/min。

1.2.2 发酵样品的 HPLC 分析 离心去除酵母细胞,取 1 mL 上清液加 0.1 mL 乙腈脱蛋白,离心分离,用活性碳脱色处理,0.45 μm 混合纤维素酯微孔膜过滤,取 20 μL 样品进样。UV 210 nm,流动相 1 mmol/L H₂SO₄,流速 1.0 mL/min,室温。

1.2.3 总酸和 pH 值测定 参考文献[8]进行。

1.2.4 丙三醇测定 变色酸比色法。

1.2.5 菌体量 测定干细胞重量。

2 结果与讨论

2.1 HPLC 定性确定发酵液中有有机酸组分

经试验比较确定,HPLC 分析发酵液中有有机酸组分的最佳条件:流动相 1 mmol/L H₂SO₄,UV 210 nm,流速 1.0 mL/min。使用紫外检测器时,丙三醇、葡萄糖、乙醇等组分没有出现。在该试验条件下一些有机酸的保留时间见表 1,丙三醇发酵液及标准有机酸 HPLC 的色谱图见图 1,图 2。

表 1 部分有机酸的保留时间

Tab.1 Retention time of some organic acids determined by HPLC/min

组分	保留时间/min	组分	保留时间/min
乙酸	8.61	反丁烯二酸	8.05
乳酸	6.91	酒石酸	4.67
丙酮酸	4.84	琥珀酸	8.06
酮戊二酸	4.43	戊酸	17.74
苹果酸	5.54	丁酸	13.00
草酸	3.86	丙酸	10.42
顺丁烯二酸	4.14	甲酸	7.96

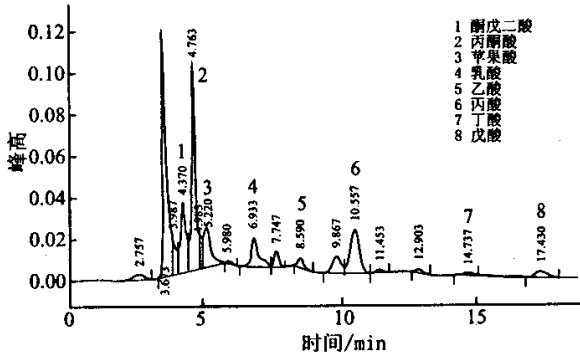


图 1 丙三醇发酵液的 HPLC 色谱图

Fig.1 The HPLC chromatogram of glycerol fermentation medium in *C. glycerolgenesis*

因发酵营养源玉米浆中有有机酸成分较少,对测定影响不大,通过标准有机酸、丙三醇发酵液色谱图的色谱峰保留时间的反复比较及气相色谱-质谱的验证(质谱数据略),确定了丙三醇发酵液的有机酸组成主要含有乙酸、乳酸、丙酮酸、苹果酸、酮戊

二酸等.

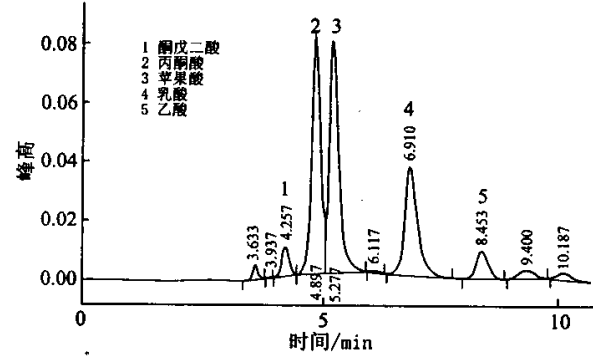


图 2 标准有机酸色谱图

Fig.2 The HPLC chromatogram of some standard organic acids

为定量测定丙三醇发酵过程中有机酸的变化过程及环境因子对有机酸质量浓度的影响,HPLC测定乙酸、乳酸、丙酮酸、酮戊二酸、苹果酸质量浓度的标准曲线如图 3,有机酸质量浓度在一定的范围内其线性相关系数、重复性、重显性如表 2. 采用 HPLC 分析发酵液中的有机酸具有方便、快速、准确等优点. 但柱子使用过程中树脂容易饱和,须经常进行反洗和再生处理.

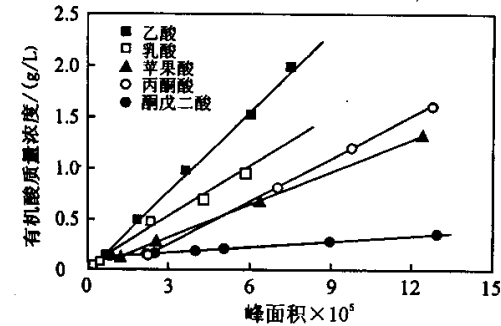


图 3 有机酸测定标准曲线

Fig.3 The standard curve of determining the organic acids by HPLC

表 2 HPLC 测定有机酸的线性相关性、重复性和重显性

Tab.2 The coefficients of correlation repeatability and reproducibility of deter mining the organic acids by HPLC

组分	测量范围/ (g/L)	线性系数	重复性 (n=5)	重显性 (n=5)
乙酸	0.1~2.0	0.9943	2.81	2.98
乳酸	0.048~0.95	0.9946	2.42	1.97
苹果酸	0.1~1.0	0.9991	3.10	3.54
酮戊二酸	0.025~0.20	0.9964	1.45	1.67
丙酮酸	0.16~1.6	0.9987	1.56	1.98

万方数据

2.2 *C. glycerolgenesis* 发酵过程中有机酸的变化趋势

C. glycerolgenesis 是耐高糖浓度、好氧发酵的菌株,在菌体生长期的高渗透压环境下额外合成胞内的相容性溶质,如丙三醇、阿拉伯醇,以保护酶活的正常生理功能,而且细胞膜的透性也发生变化以维持胞内较高浓度的相容性溶质,维持一定的渗透压与胞外低水活度相平衡.细胞作出这样的生理应答需要更多的氧和能量的消耗,这在菌体生长期就表现为溶氧质量浓度急剧下降,呼吸代谢产生了有机酸等中间代谢产物,使发酵液总酸含量增加,pH 值急剧下降. *C. glycerolgenesis* 发酵过程的发酵液总酸变化、pH 值变化如图 4 所示,发酵液总酸在菌体生长达平衡期时最高,而随着发酵时间延长总酸含量有所下降,相应的 pH 值在发酵 10 h 时降低至最低. pH 值在以后的发酵过程中随总酸的变化较少.图 5 可见,在酵母生长达平衡期时有机酸的含量最高,这与发酵液总酸含量最高是相一致的.

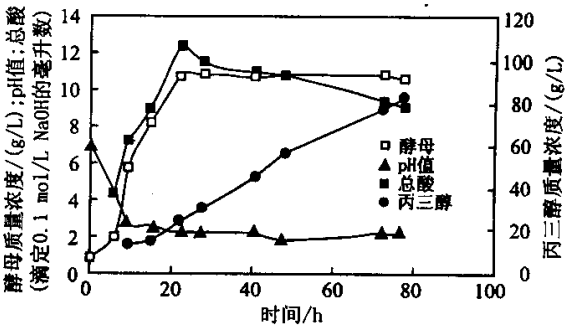


图 4 *C. glycerolgenesis* 生产发酵过程总酸和 pH 值的变化过程

Fig.4 The variation of total acidity and pH during growth and fermentation process in *C. glycerolgenesis*

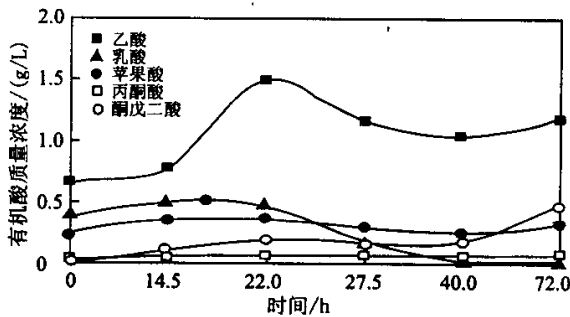


图 5 *C. glycerolgenesis* 发酵过程有机酸的变化

Fig.5 The variation of some organic acids during fermentation process in *C. glycerolgenesis*

当乙酸的积累达到高峰,约 1.6 g/L 时,乳酸、苹果酸、酮戊二酸、丙酮酸含量也较高. 但 pH 值在

10 h 以后变化较少,这是由于这些发酵代谢产生的有机酸一般是弱酸,电离程度弱,即使各个有机酸的含量有所变化,对发酵液具有一定的 pH 值缓冲作用.由此可见,*C. glycerolgenesis* 发酵代谢产生有机酸在细胞生长平衡期时最高,有机酸的产生是与菌体生长相关连的.生长进入平衡期后主要是产丙三醇的过程,此时总酸含量逐渐下降,有机酸浓度的基本变化趋势是下降的.

3 结 论

产甘油假丝酵母 *C. glycerolgenesis* 是我国目前用于发酵丙三醇工业化生产的优良菌株,其菌体在高渗透压环境下生长的生理特点是呼吸耗氧速率快,胞内较高含量合成的丙三醇、阿拉伯醇作为渗透压调节剂保护细胞的正常生长繁殖;为了维持胞

内高含量的丙三醇等相容溶质,细胞膜组成发生改变,使丙三醇不易透过.在低 pH 值环境下 H^{+} -ATP 酶活性增加,维持胞内 pH 值恒定,消耗大量的 ATP 来完成营养物质的输送;为满足特殊的生理需要,额外的能量代谢在胞内产生,生成了较多种类和数量的有机酸,这些有机酸的形成表现为发酵液总酸含量增加生长过程中 pH 值急剧下降.

在该酵母特殊的生理生长过程中,通过 HPLC 分析确定了发酵液中存在乙酸、乳酸、丙酮酸、 α -酮戊二酸、苹果酸等,这些有机酸的形成数量与菌体生长相耦联,在菌体生长达平衡期时其含量最高.与其相应,发酵液总酸含量也达到最高水平,其中乙酸为含量最高的有机酸,为 1.6 g/L.随发酵过程的进行,乙酸、 α -酮戊二酸含量又有所回升,其它有机酸含量有所下降,这说明有机酸在该酵母代谢产生丙三醇的过程有的可以再被吸收利用.

参考文献

[1] 诸葛健,方慧英.好氧发酵法生产甘油[P].中国专利:CN1110321A,1995.
[2] 诸葛健,方慧英.耐高渗透压产甘油的一个假丝酵母新种—产甘油假丝酵母[J].微生物学报,1999,39(1):68~74
[3] BELL D J, BLAKE J D. Studies on yeast differentiation using organic acid metabolites[J]. J Inst Brew,1991,97(6~8):297~315.
[4] GARRY G. Liquid Chromatographic Procedure for Fermentation Product Analysis in the Identification of Anaerobic Bacteria[J]. Applied and Environment Microbiology,1981(11):878~885
[5] GARCIA E,SANCHEZ G. Determination of organic acid in grape musts,wines and vinegars by high-performance liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography,1993,655:111~117
[6] SARIP, TIMO K. Comparison of high-performance liquid and gas chromatography in the determination of organic acids in culture media of alkaliphilic bacteria[J]. Journal of Chromatography,1993,634:273~280
[7] FALQUE E,FERNANDEZ E. Simultaneous Determination of the Major Organic Acids,Sugars,Glycerol,and Ethanol by HPLC in Grape Musts and White Wines[J]. Journal of Chromatographic Science,1996,34:254~257
[8] 管敦仪.啤酒工业手册(中册)[M].北京:轻工业出版社,1982.

(责任编辑 朱 明)