

文章编号:1009-038X(2004)02-0045-04

提纯异麦芽低聚糖的酵母菌株筛选及发酵条件

钟振声¹, 徐小艳¹, 田兴国²

(1. 华南理工大学 应用化学系, 广东 广州 510640; 2. 华南农业大学 动物科学院, 广东 广州 510642)

摘 要: 酵母菌同化单糖的能力和速度高于低聚糖, 因而可以消除异麦芽低聚糖产品中多余的葡萄糖. 通过筛选驯化, 得到较快发酵葡萄糖和麦芽糖的 D 酵母, 并对该酵母的最适发酵条件和最佳培养基组成进行了研究, 在优化培养基条件下, 得到 94.13% 的高纯度异麦芽低聚糖.

关键词: 提纯; 异麦芽低聚糖; 酵母菌; 发酵条件

中图分类号: TQ 925

文献标识码: A

Screening of Yeast Strain for Purifying Isomaltooligosaccharide and Its Fermentation Condition

ZHONG Zhen-sheng¹, XU Xiao-yan¹, TIAN Xing-guo²

(1. Department of Applied Chemistry, South China University of Technology, Guangzhou, 510640; 2. Animal College, South China Agricultural University, Guangzhou, 510642)

Abstract: The capacity and speed of yeast to assimilate monosaccharide is bigger than that of yeast to assimilate of oligosaccharide, so the redundant glucose in ismalto-oligosaccharide products can be consumed. A strain D was isolated and screened, which could fastly consume glucose and maltose. The optimal fermentation condition and medium composition of strain D was studied. Under the optimal condition, the ismalto-oligosaccharide with a purity of 94.13% was obtained.

Key words: purification; isomalto-oligosaccharide; yeast; fermentation condition

异麦芽低聚糖, 又称为分枝低聚糖和“ALO 混合物”(Anomalously linked oligosaccharides), 是不规则连接的低聚糖, 指葡萄糖基以 α -1,6 糖苷键结合而成的单糖数在 2~5 不等的一类低聚糖, 其主要成分为异麦芽糖、异麦芽三糖和潘糖等^[1]. 由于它具有增殖双歧杆菌、抗龋齿、抑制腐败物质、合成 B 族维生素, 提高机体免疫力等多种生理功能, 被称为“双歧因子”, 正日益受到消费者的青睐^[2~4].

以淀粉为原料, 酶法生产的异麦芽低聚糖产品中异麦芽低聚糖的质量分数约为 50%~60%, 其它成分主要是葡萄糖和麦芽糖等, 质量分数接近

50%. 大量葡萄糖和麦芽糖的存在对异麦芽低聚糖的生理功能产生干扰, 严重影响了低聚糖的功效和商业价值. 目前, 许多研究者试图通过不同途径来提高异麦芽低聚糖的收率和纯度, 包括筛选新酶和选育新菌种^[5~7]、离子交换^[8,9]、膜分离法^[10,11]等, 但是由于分离不彻底或成本高, 而未能实现工业化. 作者利用某些微生物对单糖和低聚糖同化能力和速度不同的原理, 筛选能发酵异麦芽低聚糖中残留的葡萄糖和麦芽糖, 而不能发酵其中的异麦芽糖、潘糖、异麦芽三糖等分枝低聚糖的酵母菌, 从而提高异麦芽低聚糖的纯度.

收稿日期: 2003-08-13; 修回日期: 2003-11-05.

作者简介: 钟振声(1955-), 男, 广东江门人, 工学学士, 副教授.

1 材料与方法

1.1 菌种

酿酒酵母 A, B, C, D 均购于广东微生物研究所。

1.2 培养基

1) 麦芽汁斜面培养: 12 °Bx 麦芽汁, 琼脂 2 g/dL。

2) 种子培养基: 葡萄糖 50 g/L, 蛋白胨 5 g/L, 酵母膏 1 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, 自然 pH 值。

3) 发酵培养基: 用异麦芽低聚糖代替葡萄糖, 其余同种子培养基。

以上培养基均于 121 °C 下高压灭菌 20 min。

1.3 分析方法

1.3.1 还原糖含量测定 3,5-二硝基水杨酸法 (DNS 法)^[12]。

1.3.2 菌体生物量测定 生物光度计测定 600 nm 处的 OD 值, 适当稀释培养液, 使 OD_{600} 小于 1。细胞干重^[14] (DCW) 的测定: 取菌液 10 mL, 10 000 r/min 离心 10 min, 弃清液, 用蒸馏水洗涤 2 次, 微波炉 (Galanz17L 机械型微波炉, 280 W) 烘干 15 min。

1.3.3 异麦芽低聚糖成分分析 用高效液相色谱 (HPLC) 法, 采用惠普 HP1100 液相色谱仪, 250 mm×4.6 mm Zorbax 氨基柱, 示差检测器, 流动相乙腈与水体积比为 70:30, 体积流量 1 mL/min。柱温 30 °C, 进料量为 10 μL ; 进样前异麦芽低聚糖过 0.45 μm 微孔滤膜。

1.4 菌株的筛选与驯化

将 4 种酵母在麦芽汁斜面培养基上活化后, 分别接种于以葡萄糖和异麦芽糖为单一碳源的平板培养基上, 28 °C 恒温培养 24 h。结果发现: 葡萄糖平板培养基上有菌落生长, 而异麦芽糖平板培养基上无菌落生长, 说明这 4 种酵母都只降解葡萄糖, 而不能降解异麦芽糖。然后, 在 4 个葡萄糖平板培养基上各挑取单一菌落接种到液体种子培养基中 (100 mL 三角瓶装液量为 30 mL), 于 30 °C, 140 r/min 摇床中增殖培养, 在对数生长期以 10% 接种量接种于发酵培养基中, 厌氧发酵 24 h, 用 HPLC 法检测发酵后的异麦芽低聚糖组分, 得到葡萄糖和麦芽糖降解率最高的 D 酵母。为使 D 酵母能耐受高渗透压, 适应高糖度的生长环境, 对其进行驯化。然后用平板划线法分离复筛, 将较大的单一菌落转移到斜面培养基中扩大培养, 4 °C 保存备用。

2 结果与讨论

2.1 最适培养时间的确定

将活化的 D 酵母菌种接种于种子培养基中 (OD_{600} 值为 0.1 左右), 培养温度为 30 °C, 摇床转速 140 r/min。定时取样测定培养液中菌体生物量 OD_{600} 的变化, 以 OD_{600} 为纵坐标, 培养时间为横坐标, 绘出生长曲线 (见图 1)。在开始的 6 h 内, OD_{600} 基本无变化, 这说明菌株在发酵前期有一段延滞期, 菌株在逐渐适应新的培养基环境, 6~26 h 为对数生长期, 到 30 h 时达到最高, 然后开始下降, 进入衰亡期, 此时菌株逐渐衰老或自溶。因此, 最适培养时间为 20~26 h。

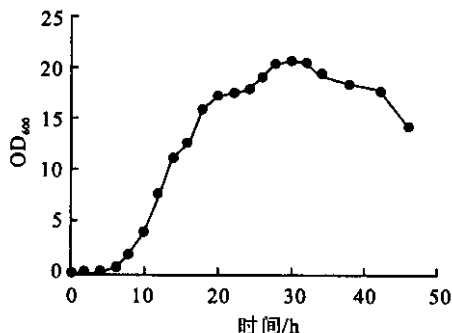


图 1 D 菌株的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of strain D

2.2 温度的影响

温度对酵母菌发酵产生较大的影响, 过高或过低的温度会使酵母菌停止生长或休眠甚至死亡。将 D 菌株在不同温度下 (26, 28, 30, 32, 34 °C) 接种于发酵培养基中厌氧发酵 24 h。从图 2 可知, 在 30~32 °C 时, D 菌株生长最好, 还原糖残余率最小, 低于 30 °C 或高于 32 °C 都不利于酵母菌的生长和还原糖的降解。

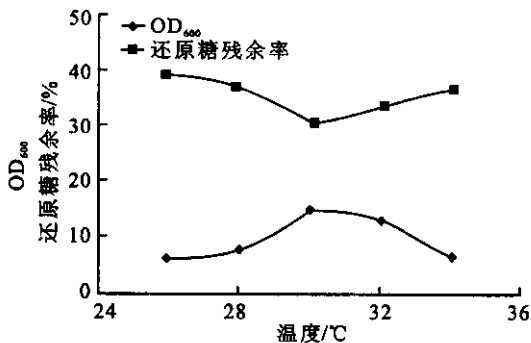


图 2 温度对发酵的影响

Fig. 2 Effect of temperature on fermentation

2.3 pH 值的影响

酵母菌适于在偏酸性环境下生长与发酵, 若超出其适应范围, 酵母菌将受到抑制或不能生长。主

要是由于温度影响发酵过程中酶的活性. 用柠檬酸一磷酸氢二钠作为缓冲液调节发酵培养基的 pH 值. 将 D 菌株接种于不同 pH 值(2. 2, 3. 0, 4. 0, 5. 0, 6. 0, 7. 0)的发酵培养基中, 30 ℃ 厌氧发酵 24 h, 从图 3 可知, pH 值在 4~5 时, 还原糖的残余率最小, 只有 29. 83%, 而且此时 OD 值最大.

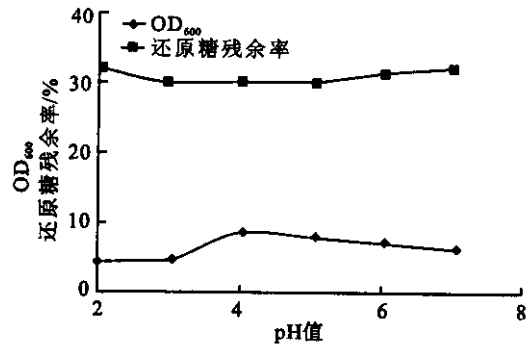


图 3 pH 值对发酵的影响

Fig. 3 Effect of pH on fermentation

2. 4 氮源的影响

氮素是微生物合成细胞物质的必须营养元素, 各种酶及核酸、蛋白质的产生均需要氮素. 工业上的氮源分为两类: 有机氮源和无机氮源. 考察 D 菌株对 7 种氮源的选择, 结果见图 4. 可以看出, 有机氮源明显优于无机氮源, 而且添加酵母膏时的细菌生长量和还原糖降解率明显比其它的大. 这和 V. Arasaratnam 等人^[15]报道的结果一致. 这可能是由于酵母膏中含有氨基酸、维生素及有机酸像丙酮酸、甘油酸等. 为了确定最适的酵母膏质量浓度, 将 D 菌株接种于含不同质量浓度(0, 5, 10, 15, 20, 25 g/L)酵母膏的发酵培养基中, 30 ℃ 厌氧发酵 24 h.

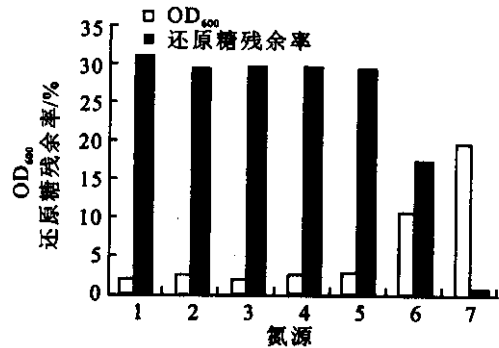


图 4 氮源对发酵的影响

Fig. 4 Effect of Nitrogen sources on fermentation

从图 5 可看出, 当酵母膏质量浓度大于 15 g/L (含氮 1. 2 g) 时, 降解率的增加变得缓慢. 从经济角度考虑, 选用 NH₄Cl 代替部分酵母膏, 并使二者含

氮元素之和为 1. 2 g. 为了确定 NH₄Cl/酵母膏的最佳比值, 将 D 菌株接种于不同比值(100/0, 75/25, 50/50, 25/75, 0/100)的发酵培养基中, 30 ℃ 厌氧发酵 24 h. 从图 6 可以看出, NH₄Cl/酵母膏比值为 50/50 时, 还原糖残余率最小, 只有 27. 6%, 此时细胞干重最大.

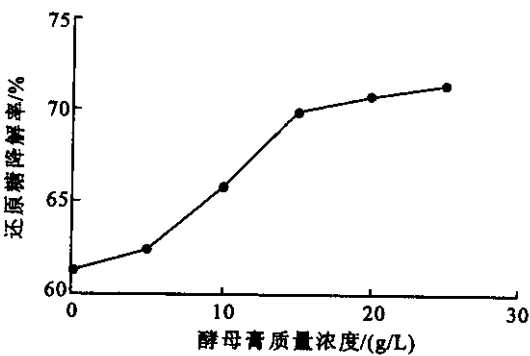


图 5 酵母膏质量浓度对发酵的影响

Fig. 5 Effect of yeast extract on fermentation

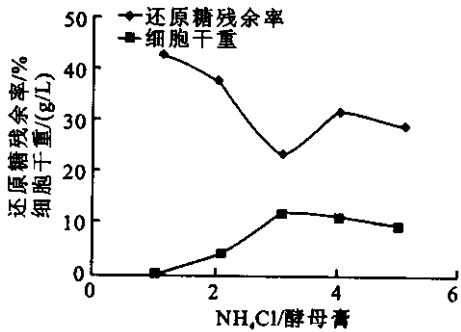


图 6 NH₄Cl/酵母膏对发酵的影响

Fig. 6 Effect of NH₄Cl/yeast extract on fermentation

2. 5 营养盐的影响

在配制培养基时必须以无机盐形式加入各种离子或元素, 这些无机营养盐是酶活性基团的组成部分, 加入质量浓度过低, 菌体生长缓慢; 加入质量浓度过高, 又抑制菌体生长, 因此必须掌握合适的质量浓度范围. 根据均匀设计实验的原理和使用原则^[13], 按均匀设计表 U6 * (6⁴) (见表 1) 进行实验方案的设计和实验, 考察 3 种营养盐对菌体生长量和葡萄糖降解的影响. 应用中国均匀设计学会和东北制药总厂研究院联合研制的“均匀设计软件包”进行数据处理和线性回归, 得到方程:

$$Y_1(OD_{600}) = 1.04589 - 0.758371X_1 + 1.70281X_1X_2 + 0.279542X_1X_3 - 1.45354X_2^2$$

复相关系数: $R = 0.999356358$

$$Y_2(\text{还原糖残余率}) = 0.952751 + 0.36779X_2 - 0.476381X_3 - 0.310071X_1X_2 - 1.35051X_2^2$$

复相关系数: $R = 0.884385492$

相对而言, $X_2(MgSO_4 \cdot 7H_2O)$ 对 Y_1, Y_2 的影

响最显著,且 X_1, X_2 之间存在交互作用. 理论最优值为: $X_1=0.5, X_2=0.5, X_3=0.05$, 预报最优结果为 $Y_2=39.99\%$.

表 1 营养盐组成的均匀设计表 $U_6^*(6^4)$

Tab. 1 The uniform design of nutrient salts formulation

KH_2PO_4 质量浓度/ (g/L)	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度/ (g/L)	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度/ (g/L)	OD_{600}	还原糖 残余 率 / %
1	0.5	0.1	0.02	22.173 45.99
2	0.6	0.3	0.05	18.735 42.73
3	0.7	0.5	0.01	13.397 41.06
4	0.8	0.0	0.04	19.815 44.87
5	0.9	0.2	0.00	19.951 47.68
6	1.0	0.4	0.03	21.197 43.26

2.6 发酵时间的影响

定时取样,用 HPLC 法检测异麦芽低聚糖各组
分随时间的变化. 从图 7 可看出,前十几小时内,麦
芽糖的相对含量增加;发酵 24 h 时,葡萄糖降解完
全,此时麦芽糖开始降解,到 37 h 时,异麦芽低聚糖
和麦芽糖的含量基本恒定不变,所以发酵以 37 h 为
宜.

3 结 论

通过对酵母菌的筛选驯化,得到能较快降解还

参考文献:

[1] 耿予欢,张本山,于书娟. 异麦芽低聚糖的生产及生理功能[J]. 食品工业, 1997, (3): 3—5.
[2] 蒋世琼. 应用生物技术开发淀粉异麦芽糖[J]. 南宁职业技术学院学报, 1999, (2): 33—35.
[3] 童忠良, 贾冬舒. 异麦芽低聚糖的生产、开发与应用[J]. 浙江工业大学学报, 2001, 29(3):285—289.
[4] Miyake T, Yoshida M, Takeuchi K. Imparting low-or anti-cariogenic property to orally-usable products[P]. US Patent; 4518581, 1985-03-06.
[5] Kuriki T, Yanase M, Takata H, *et al.* A new way of producing isomalto-oligosaccharides syrup by using the transglycosylation reaction of neopullulanase[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59: 953—959.
[6] 金其荣, 徐亲勤. 异麦芽低聚糖性质及生产与应用[J]. 淀粉与淀粉糖, 1996, (3): 5—9.
[7] Tanriseven A, Dogan S. Production of isomalto-oligosaccharides using dextranucrase immobilized in alginate fibres[J]. *Process Biochemistry*, 2002,37:1111—1115.
[8] 耿予欢, 张本山, 高大维, 等. 强酸性阳离子交换树脂分离纯化异麦芽低聚糖的研究[J]. 食品科学, 1999, (5): 6—8.
[9] Bhatt S. Ion-exchange process of commercial separation of fructose[J]. *Indian Sugar*, 1994, 11: 637—638.
[10] Goulas A K, Kapasakalidis P G, Sinclair H R, *et al.* Purification of oligosaccharides by nanofiltration[J]. *Journal of Membrane Science*, 2002, 209: 435—440.
[11] Kamada T, Nakajima M, Nabetani H, *et al.* Availability of membrane technology for purifying and concentrating oligosaccharides[J]. *Eur Food Res Technol*, 2002, 214: 435—440.
[12] 赵亚华, 高向阳. 生物化学实验技术教程[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2000.
[13] 方开泰. 均匀设计与均匀设计表[M]. 北京: 科学出版社, 1994.
[14] Van Dijiken J P, Bauer J, Duboc P, *et al.* An interlaboratory comparison of physiological and genetic properties of four *Saccharomyces cerevisiae* strains[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, 26: 706—714.
[15] Arasaratnam V, Senthuran A, Bahasubramaniam K. Supplementation of whey with glucose and different nitrogen sources for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, 11: 482—486.

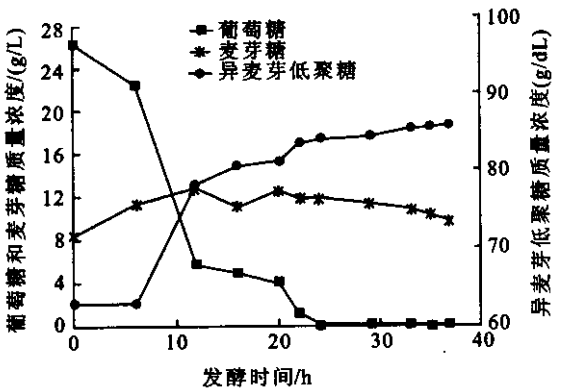


图 7 发酵时间的影响

Fig. 7 Effect of fermentation time

原糖的 D 菌株. 最适发酵条件为: 温度 30 ℃, pH 值 4~5, 接种量 3%, 发酵时间 37 h. 最优培养基组成为: 异麦芽低聚糖 300 g/L, NH_4Cl /酵母膏为 50/50 (共含氮 1.2 g), KH_2PO_4 0.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g/L, 在优化培养基的条件下, 得到异麦芽低聚糖的纯度为 94.13%. 这种方法设备投资较少, 但在用酵母菌代谢葡萄糖时, 所产生的代谢副产物如甘油、杂醇油、酯类等可能给产品带来不良风味. 如果用于生产风味食品, 需在反应后采取去味措施.