文章编号: 1673-1689(2010)03-0458-06

法夫酵母产新科斯糖的发酵条件

宁亚维[1,2], 张静娟[2], 苏 丁[2], 杨 娜[2], 徐学明[1,2]
(1. 食品科学与技术国家重点实验室,江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 食品学院,江苏 无锡 214122)

摘 要: 通过单因素实验及正交试验对法夫酵母摇床发酵产新科斯糖的培养基组成和培养条件进行优化,得出该菌株产新科斯糖的最佳发酵条件为: 蔗糖 110 g/L, 玉米浆粉 8 g/L, 种龄 48 h, 接种体积分数 10%, 发酵周期 24 h, 初始 pH 6.5, 摇床转速 220 r/min, 发酵温度 18 ℃。经优化后新科斯糖产量最高可达 73.2 g/L, 蔗糖利用率为 66.5%, 比优化前发酵效率提高了 87.1%。

关键词: 法夫酵母; 新科斯糖; 蔗糖; 摇瓶发酵
中图分类号: TQ 920.1 文献标识码: A

Studies on Fermentation Conditions for Production of Neokestose by *Xanthophyllomyces dendrorhous*

NING Ya-wei[1,2], ZHANG Jing-juan[2], SU Ding[2], YANG Na[2], XU Xue-ming[1,2]
(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In order to further improve the titer and yield of neokestose production by Xanthophyllomyces dendrorhous, the medium compositions and environmental conditions for neokestose production were optimum by the single factor experiment and the orthogonal experiments, and listed as follows: sucrose 110 g/L, dried corn steep liquor powder 9 g/L, pH 6.5, rotation speed of shaker 220 r/min and inoculation size10% in 25 mL of culture medium in the 250 mL flasks at 18 ℃ for 24 h. The concentration of neokestose by Xanthophyllomyces dendrorhous 269 was achieved at 73.2 g/L, the yield of neokestose on sucrose reached at 66.5%, which was 1.87 times than that of the control.

Key words: *Xanthophyllomyces dendrorhous*, neokestose, fructo-oligosaccharides, submerged fermentation

---

蔗果低聚糖(Fructooligosaccharides, FOS), 又称寡果糖或低聚果糖,广泛存在于天然水果和蔬菜中,不仅口感良好,而且具有优良的生理功能。它能促进肠道双歧杆菌增殖,调节肠道菌群平衡, 改善和调节肠道功能,防治便秘和腹泻; 另外,具有低能量或无能量、预防龋齿、降低血清胆固醇、降低血

收稿日期: 2009-07-08
基金项目: 教育部优秀人才计划项目(NCET-07-0379)。
* 通信作者: 徐学明(1968-), 男,江苏苏州人, 教授,工学博士,博士生导师,主要从事粮食油脂及植物蛋白工程方面的研究。Email: xmbest@126.com

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

脂和血压等功效[1]。由此, FOS 是一种国际上公认的功能性养生食品和新型糖源, 在食品、饲料、医药、保健品等行业应用广泛[2]。目前工业上主要利用黑曲霉 *Aspergillus niger*[3], 青霉 *Penicillium citrinum*[4], 运动单胞菌 *Zymomonas mobilis*[5], 乳杆菌 *Lactobacillus reutri*[6] 等来生产低聚果糖。由于大多数酵母所产的果糖苷酶具有很强的水解能力, 最终又将合成的低聚果糖水解, 导致低聚果糖产量甚少[7], 因此目前对于酵母产低聚果糖的研究较少。

新科斯糖(neokestose) 是一种蔗果三糖族低聚糖, 由果糖基 G-2 与蔗糖分子中的葡萄糖基 G-6 位相连所得。它可由法夫酵母(*Xanthophyllomyces dendrorhous*) 发酵来生产。目前国内外对法夫酵母的研究主要集中于虾青素的发酵生产上, 如高产虾青素菌株选育[8]、发酵工艺研究[9]、色素提取[10]、色素稳定性[11] 及虾青素的功能特性[12] 等, 且已能实现规模化生产。而以法夫酵母为出发菌株, 蔗糖为碳源进行发酵产新科斯糖的研究则鲜为报道, Kilian 等人[13] 发现法夫酵母在以蔗糖为碳源的培养基上生长时能积累新科斯糖, 国内江南大学利用法夫酵母生产新科斯糖的方法已获国家发明专利授权[14], 苏丁[15] 对法夫酵母所产新科斯糖的结构进行了鉴定。作者主要就法夫酵母产新科斯糖的发酵条件进行了研究。

1　材料与方法

1.1　实验材料

菌株: 法夫酵母 269, 作者所在实验室选育[8]。

培养基(g/L): 种子培养基和发酵培养基见文献[14]。

主要试剂: 新科斯糖标准品为作者所在实验室制备[15], 蔗糖等其他试剂均为国产分析纯。

1.2　实验方法

1.2.1　种子培养　从斜面上挑一环菌, 接入装有 25 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 22 ℃、220 r/min 培养 48 h 作为种子液。

1.2.2　摇瓶发酵　将种子培养液以体积分数 5% 接入发酵培养基, 摇床转速 220 r/min, 22 ℃发酵 32 h。

1.2.3　分析方法

1) 新科斯糖的测定: HPLC 为岛津 LC-20A。色谱柱为 Waters Sugarpak1, 6.5 mmid × 300 mm; 流动相为超纯水; 流速为 0.5 mL/min; 检测器为示差折光检测器; 进样体积为 10 μL。

2) 生物量的测定: 干重法测定[16]。

2　结果与讨论

2.1　发酵培养基的优化

2.1.1　蔗糖质量浓度对发酵生产新科斯糖的影响

碳源是构成菌体和合成新科斯糖的底物来源。通常作为碳源的物质, 主要是各种糖类, 淀粉等。根据文献[17] 报道, 碳源除了蔗糖外, 葡萄糖、果糖、淀粉等均对果糖基转移酶活性不利。蔗糖既是酶作用的底物又是一种诱导物, 故选择蔗糖作为发酵产糖的惟一碳源。

以 5.22 g/L 酵母膏为氮源, 蔗糖质量浓度设置为 70、90、110、130、150 g/L 5 个水平进行比较, 在 22 ℃、220 r/min 发酵 32 h, 结果见图 1。

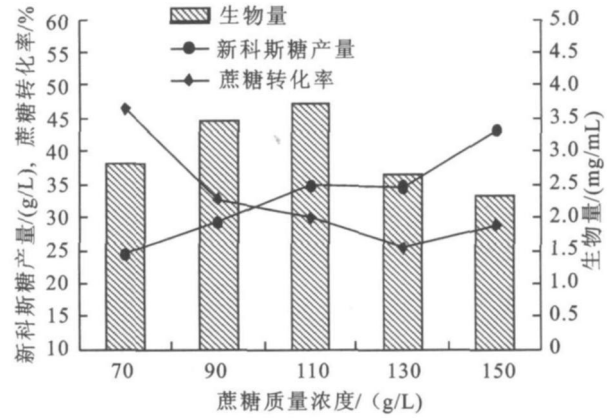


图 1　蔗糖质量浓度对法夫酵母产糖的影响

Fig. 1　Effect of sucrose concentration on the neokestose production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*

由图 1 可以看出, 随着蔗糖质量浓度增加, 新科斯糖质量浓度呈一定的上升趋势, 但糖利用率随糖质量浓度的增加而降低。综合考虑所得新科斯糖产量和蔗糖转化率, 选取蔗糖质量浓度为 110 g/L进行摇瓶发酵。

2.1.2　氮源对发酵生产新科斯糖的影响　以 110 g/L 蔗糖为碳源, 分别用等摩尔量的不同氮源取代酵母膏, 在 22 ℃、220 r/min 下发酵 32 h, 结果见图 2。

由图 2 可知, 当利用玉米浆粉作为发酵氮源时, 菌体生长较好且新科斯糖产量最高, 这与徐学明[16] 等的研究结果相一致。玉米浆粉(或玉米浆)能显著促进法夫酵母生长。玉米浆粉除含有丰富的可溶蛋白质、生长素等为菌体生长繁殖提供营养外, 还可能含有果糖苷酶合成的前体物质。同时若采用玉米浆粉做氮源不仅有利于产物合成, 而且还可在一定程度上降低发酵成本。因此作者选取玉米浆粉作为发酵培养基氮源。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

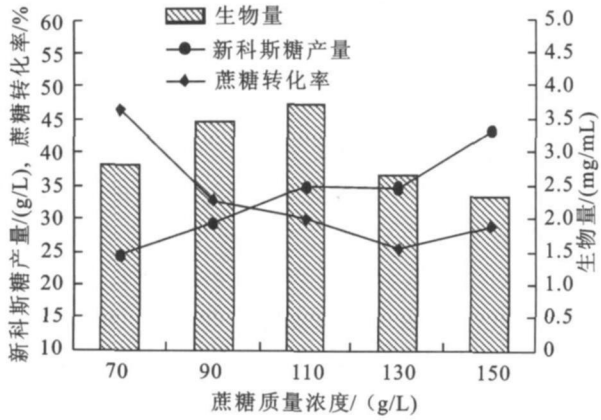


图2 氮源对法夫酵母产糖的影响

Fig. 2 Effect of nitrogen sources on the neokestose production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*

2.1.3 玉米浆粉质量浓度对发酵生产新科斯糖的影响 蔗糖 110 g/L, 配制玉米浆粉浓度分别为 2、4、6、8、10 g/L 的培养基, 在 22 ℃、220 r/min 下发酵 32 h 后测定新科斯糖产量和生物量, 结果见图 3。

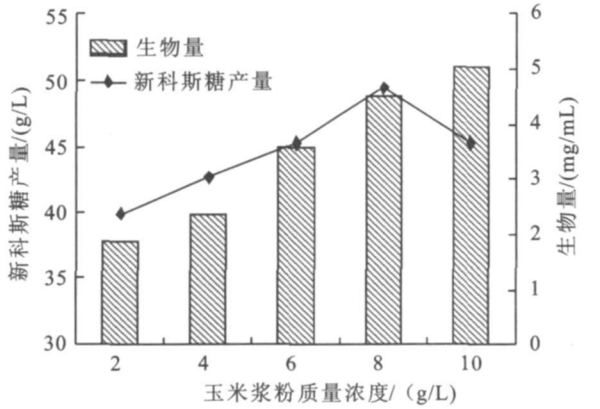


图3 玉米浆粉质量浓度对法夫酵母产糖的影响

Fig. 3 Effect of corn syrup powder concentration on the neokestose production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*

图 3 表明, 适当提高玉米浆粉质量浓度可提高新科斯糖产量, 但玉米浆粉质量浓度大于 8 g/L 时, 由于氮源过多导致菌体生长过旺, 使底物蔗糖过早耗尽, 从而使得新科斯糖的合成受到抑制。

2.2 发酵条件的优化

2.2.1 接种体积分数对法夫酵母产新科斯糖的影响 分别以体积分数 2%、4%、6%、8%、10%、12% 的接种量在 25 mL/250 mL 发酵培养基中接入种子液, 32 h 后测定其新科斯糖产量及生物量, 结果见图 4。

由图 4 可知, 接种体积分数为 10% 时, 新科斯糖产量最高。随着接种体积分数的增加, 新科斯糖产量也随之增大, 但当接种体积分数大于 10% 时,

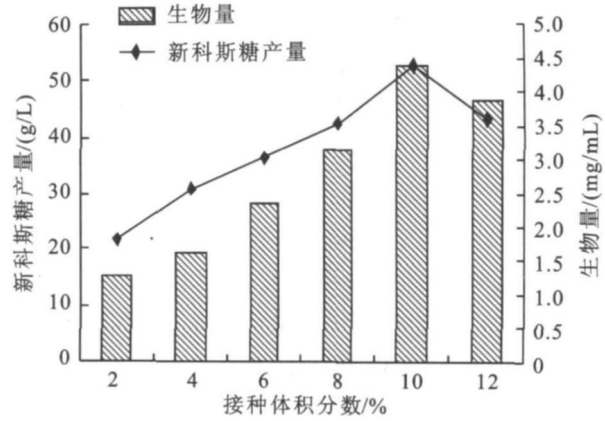


图4 接种体积分数对法夫酵母产糖的影响

Fig. 4 Effect of inoculum concentration on the neokestose production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*

新科斯糖产量开始降低。这表明较大的接种体积分数可以缩短发酵周期, 减少杂菌的生长机会; 但接种体积分数过高则引起溶氧不足, 最终导致新科斯糖产量降低。***Chien*** [18] 等在用固定化 *Aspergillus japonicus* 生产低聚果糖时也有类似的发现。

2.2.2 初始 pH 值对法夫酵母产新科斯糖的影响 蔗糖 110 g/L, 玉米浆粉为 8 g/L, 配制 pH 分别为 3.0、4.0、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 的培养基, 22 ℃、220 r/min 下发酵 32 h 后测定其新科斯糖产量及生物量, 结果见图 5。

初始 pH 值对法夫酵母产糖影响较大。pH 值在 5~8 范围内时新科斯糖产量均较高。这一结果表明, 法夫酵母所产果糖基转移酶的最适 pH 值接近中性, 与 kilian[19] 的研究一致。

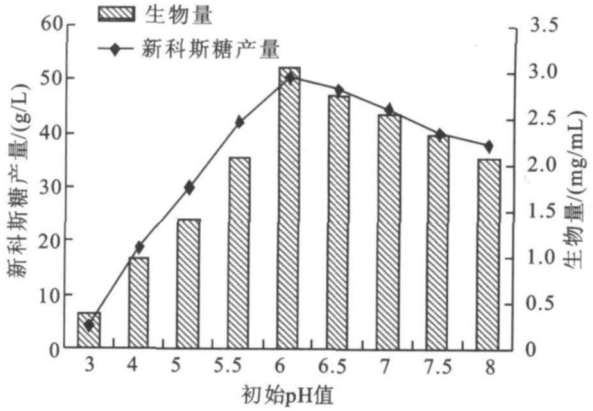


图5 初始 pH 值对法夫酵母产糖的影响

Fig. 5 Effect of initial pH on the neokestose production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*

2.2.3 发酵温度对法夫酵母产新科斯糖的影响 蔗糖 110 g/L, 玉米浆粉 8 g/L, pH 6.0, 温度分别设置为 18、20、22、24、28、32 ℃, 在 220 r/min 的转速下发酵 32 h 后测定新科斯糖产量及生物量。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

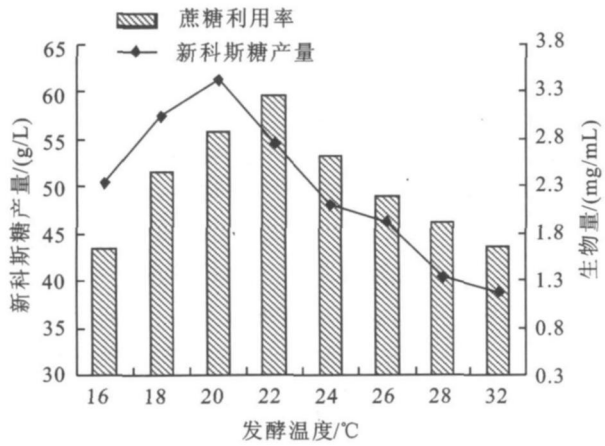


图 6　发酵温度对法夫酵母产糖的影响

Fig. 6　Effect of temperature on the neokestose production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*

由图 6 可知, 法夫酵母发酵产新科斯糖在培养温度为 20 ℃时效果最好, 新科斯糖产量最高, 这与徐学明等[16] 的研究结果一致, 法夫酵母的发酵温度较低, 在 16~ 22 ℃范围内生长较好。

2 2 4　*发酵时间对发酵生产新科斯糖的影响*　以体积分数 10% 接种量将种子培养基接入上述已优化的发酵培养基, 发酵 4、8、12、16、24、36、48、72 h 后分别测定新科斯糖产量及生物量, 结果见图 7。

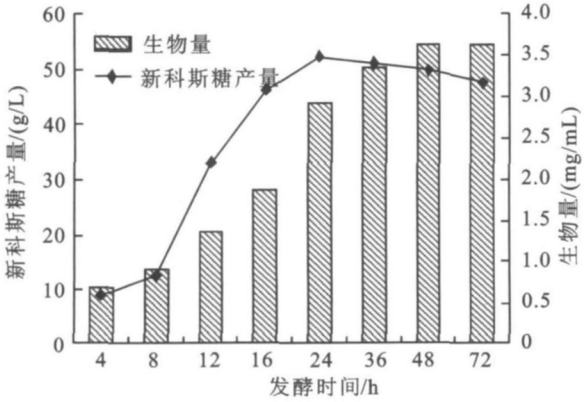


图 7　法夫酵母发酵进程曲线

Fig. 7　The time-course of the neokestose production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*

图 7 进程曲线表明, 前 12 h 时酵母迅速利用蔗糖, 新科斯糖迅速积累, 到 24 h 时, 新科斯糖产量达到最高, 以后各糖质量浓度基本保持不变, 因此确定发酵时间为 24 h。

2. 2. 5　*种龄对法夫酵母产新科斯糖的影响*　适宜种龄菌体接种可以缩短发酵周期, 同时种龄也是决定产酶的重要因素, 因此利用最佳种子进行发酵可获取较高新科斯糖产量。

作者分别选取培养 16、24、32、40、48、60、72、84 h 后的种子培养基, 均以体积分数 10% 接种量接入装有 25 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 初始 pH 为 6 0, 培养 24 h 后分别测定新科斯糖产量和生物量。由图 8 可知, 新科斯糖产量以 48 h 的种龄为最佳。种龄小于 48 h 时, 由于质量细胞处于幼嫩的指数期, 接入发酵培养基时受高质量浓度蔗糖抑制作用较明显, 生物量小, 果糖苷酶较少, 因此新科斯糖产量较低。

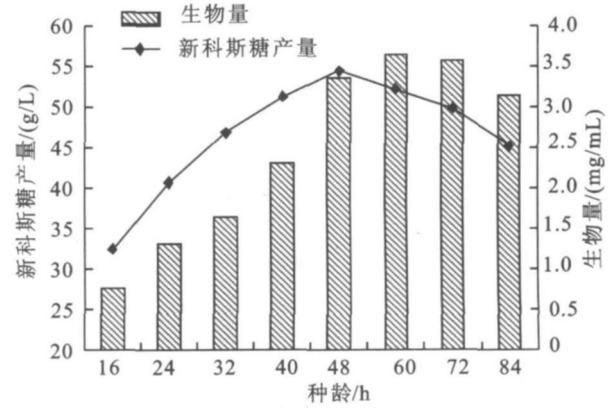


图 8　种龄对法夫酵母产新科斯糖的影响

Fig. 8　Effect of inoculum age on the neokestose production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*

2. 3　正交试验

通过反复试验得知, 蔗糖质量浓度、初始 pH 值、发酵温度是影响新科斯糖产量的重要因素。实验以新科斯糖产量和蔗糖转化率为指标, 采用正交试验优化法夫酵母产新科斯糖的发酵条件, 结果见表 1~ 3。

表 1　正交试验因素及水平

Tab. 1　The factors and levels of experiment

因素 水平	*A* 蔗糖质量浓度/(g/ L)	*B* pH 值	*C* 温度/ ℃
1	70	5	18
2	110	6. 5	20
3	150	8	22

表 2　$L_9(3^4)$ 正交试验方案及结果

Tab. 2　The design and results

试验	*A*	*B*	*C*	新科斯糖 产量/(g/ L)	蔗糖 利用率/ %
1	1	1	1	36. 4	52. 00
2	1	2	2	38. 2	54. 57
3	1	3	3	35. 2	50. 29
4	2	1	2	45. 6	41. 45
5	2	2	3	52. 3	47. 55
6	2	3	1	50. 7	46. 09
7	3	1	3	58. 6	39. 07
8	3	2	1	69. 2	46. 13
9	3	3	2	64. 5	43. 00

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 3 新科斯糖产量、蔗糖转化率极差分析结果

Tab. 3 The range analytic results of neokestose and sucrose yield

指标	项目	A	B	C
新科斯糖产量/(g/L)	k_1	36.6	46.87	52.1
	k_2	49.53	53.23	49.43
	k_3	64.1	50.13	48.7
	R	27.5	6.36	3.4
	最优组合		$A_3B_2C_2$	
蔗糖转化率/%	k_1	52.29	44.17	48.08
	k_2	45.03	49.42	46.34
	k_3	42.73	46.46	45.63
	R	9.55	5.24	2.44
	最优组合		$A_1B_2C_1$	

由图 9 正交试验结果效应曲线图可以看出: 在对新科斯糖产量的影响中, 影响因素为 $A > B > C$; 表 4 方差分析表明, 蔗糖质量浓度对新科斯糖产量影响极显著, 是主要影响因素。这是由于在产糖过程中, 蔗糖作为果糖苷酶的诱导物以及新科斯糖合成的底物而发挥了主要作用。在对蔗糖利用率的影响中, 影响因素为 $A > B > C$, 其中蔗糖质量浓度和 pH 值影响显著。这一方面证实了蔗糖的诱导作用, 另一方面说明 pH 值直接影响果糖苷酶的活力, 即 pH 值过高或过低都会使其水解能力下降。综合两个指标及极差分析, 确定最佳发酵条件为: 蔗糖 110 g/L, 玉米浆粉 8 g/L, pH 6.5, 接种体积分数 10%, 18 ℃, 24 h。以此条件发酵培养, 结果所得新科斯糖产量为 73.2 g/L, 蔗糖利用率为 66.5%, 比优化前发酵效率提高了 87.1%。

表 4 正交试验方差分析表

Tab. 4 The variance analysis of orthogonal results

指标	变异来源	平方和	自由度	方差	F 值	显著水平
新科斯糖产量/(g/L)	A	1 135.709	2	567.854 4	208.684 8	0.004 77
	B	60.815 56	2	30.407 78	11.174 77	0.082 14
	C	19.208 89	2	9.604 44	3.529 6	0.220 77
	误差	5.442 22	2	2.721 11		
	总和	1 221.176				
蔗糖转化率/%	A	0.014 92	2	0.007 46	40.434 81	0.024 13
	B	0.004 15	2	0.002 07	11.238 71	0.081 71
	C	0.000 95	2	0.000 47	2.566 99	0.280 35
	误差	0.000 37	2	0.000 18		
	总和	0.014 92	2	0.007 46		

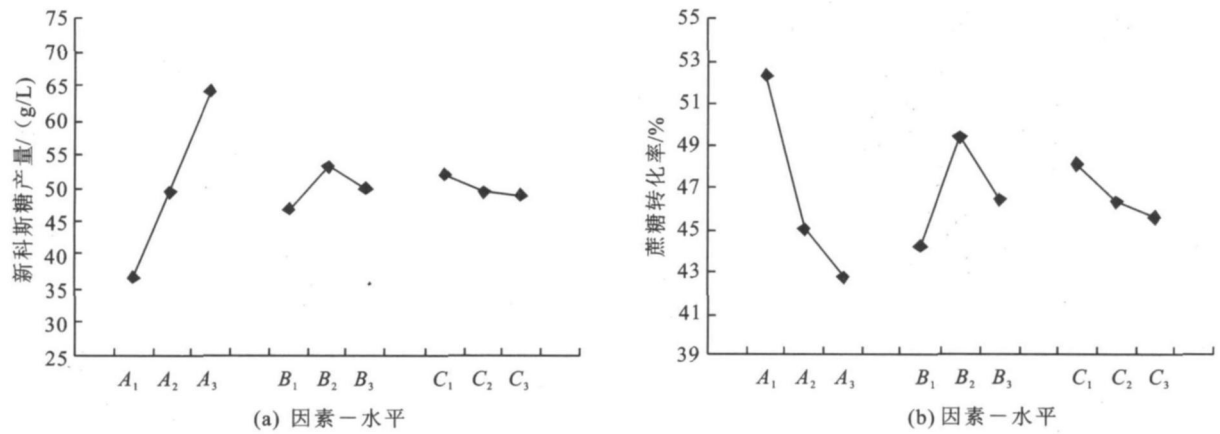


图 9 正交试验效应曲线图

Fig. 9 The effect curve of orthogonal experiment

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　结　语

法夫酵母 269 能有效地将蔗糖转化为功能性低聚果糖——新科斯糖。该菌株产新科斯糖的能力受蔗糖质量浓度、氮源种类与质量浓度、培养基初始 pH 值、种龄、接种体积分数、发酵温度和时间等因素影响,其中尤其以蔗糖质量浓度与初始 pH 值影响最大。优化条件下发酵可使新科斯糖产量达到 73.2 g/L 发酵液,比优化前发酵效率提高 87.1%。

参考文献(References):

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

[2] 尤新.功能性低聚糖发展动向及前景[J].中国食品添加剂,2008,3:45-49.
YOU Xin. Function and prospect on oligosaccharide[J]. **China Food Additives,** 2008,3:45-49. (in Chinese)

[3] Nizhizawa K, Nakajima M, Nabetani H. Kinetic study on transfructosylation by (-fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611 and availability of a membrane reactor for Fructooligosaccharide production[J]. **Food Science and Technology Research,** 2001, 7:39-44.

[4] Hayashi S, Yoshiyama T, Fuji N, et al. Production of a novel syrup containing neofructooligosaccharides by the cells of *Penicillium citrinum*[J]. **Biotechnology Letters,** 2000,22: 1465-1469.

[5] Blecker C, Fouguies C, Van Herck J C, et al. Kinetic study of the acid hydrolysis of various oligofructose samples[J]. **Journal of Agricultural Chemistry,** 2002,50:1602-1607.

[6] Van Hijum S, Van Geel-Schutten G H, Rahouri H, et al. Characterization of a novel fructosyl transferase from *Lactobacillus reutri* that synthesizes high molecular weight inulin and inulin oligosaccharides[J]. **Applied and Environmental Microbiology,** 2002, 68:4390-4398.

[7] 郑建仙.功能性食品生物技术[M].北京:中国轻工业出版社,2004.

[8] 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.
XU Xue-ming, JIN Zheng-yu, LU Yu-hua. Studies on astaxanthin overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma*[J]. **Food and Fermentation Industries,** 2000,26(5):22-27. (in Chinese)

[9] 徐学明,金征宇,刘当慧.法夫酵母产虾青素的补料发酵[J].食品与生物技术学报,2002,21(1):5-9.
XU Xue-ming, JIN Zheng-yu, LIU Dang-hui. Fed-batch culture of astaxanthin producing strain *Phaffia rhodozyma*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology,** 2002,21(1):5-9(in Chinese)

[10] Johnson E A. *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey[J]. **Int Microbiol,** 2003,6:169-174.

[11] 徐学明,陈晓明,金征宇.法夫酵母中虾青素的稳定性研究[J].食品与生物技术学报,2006,25(4):29-36.
XU Xue-ming, CHEN Xiao-ming, JIN Zheng-yu. Stability of astaxanthin from *Xanthophyllomyces dendrorhous* durning storage[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology,** 2006,25(4):29-36.

[12] An G H, Choi E S. Preparation of the red yeast, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, as feed additive with increased availability of astaxanthin[J]. **Biotechnol Lett,** 2003,25: 767-771.

[13] Kilian S G, Sutherland F C W. Transport-limited sucrose utilization and neokestose production by *Phaffia rhodozyma*[J]. **Biotechnol Lett,** 1996,18: 975-980.

[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] 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.
SU Ding, CHEN Xiao-ming, XU Xue-ming. Identification of the structure of oligosaccharide produced from *Xanthophyllomyces dendrorhous*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology,** 2009,28(2):197-200.

[16] 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.
XU Xue-ming, JIN Zheng-yu, LIU Dang-hui. Astaxanthin production by *Phaffa rhodozyma*[J]. **Journal of Wuxi University of Light Industry,** 2000,19(3):230-235.

[17] Bonnin E, Thibault J F. Galactooligosaccharide production by transfer reaction of an exogalactanase[J]. **Enzyme Microb Technol,** 1996,19:99-106.

[18] Chien C S, Lee W C, Lin T J. Immobilization of *Aspergillus japonicus* by entrapping cells in gluten for production of fructooligosaccharides[J]. **Enzyme Microb Technol,** 2001,29:257-525.

[19] Kritzinger, Kilian. The effect of production parameters on the synthesis of the prebiotic trisaccharide, neokestose, by *Xanthophyllomyces dendrorhous (Phaffia rhodozyma)*[J]. **Enzyme Microb Technol,** 2003,32:728-737.

(责任编辑:李春丽)

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net