

利用组合策略提高汉逊酵母发酵生产 D-阿拉伯糖醇

钱卫东, 宁肖肖, 赵德志, 王兰, 李梦媛, 陈超, 常凯 (陕西科技大学生命科学与工程学院, 陕西西安 710021)

摘要 [目的]提高多形汉逊酵母发酵生产 D-阿拉伯糖醇的产量。[方法]通过正交试验确定了用多形汉逊酵母 DL-1 发酵生产 D-阿拉伯糖醇发酵培养基的最佳组分,进而结合培养温度对发酵过程的影响,获得运用变温策略提高多形汉逊酵母生产 D-阿拉伯糖醇的方法。[结果]最优发酵培养基组分为:葡萄糖 200 g/L,蛋白胨 20 g/L,酵母浸粉 12 g/L, Triton X-100 10 g/L,硫酸铵 3.0 g/L,七水硫酸镁 2.5 g/L,磷酸二氢钾 2.5 g/L;多形汉逊酵母 DL-1 的最适生长温度和 D-阿拉伯糖醇最适合合成温度分别为 37 ℃和 34 ℃;变温调控发酵方法为:将发酵培养基在 37 ℃培养 24 h 后,升温到 48 ℃继续培养 24 h,再降温至 34 ℃继续培养 96 h 得到发酵液。采用该方法发酵结束后 D-阿拉伯糖醇产量为 114.92 g/L,比恒温发酵(37 ℃、48 ℃、34 ℃)分别提高了 30.25%、208.66%、20.93%。[结论]该方法可以提高多形汉逊酵母发酵生产 D-阿拉伯糖醇。

关键词 D-阿拉伯糖醇,多形汉逊酵母 DL-1,正交试验,变温调控

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2014)23-07726-03

An Optimal Combination Strategy to Increase D-arabitol Production by *Hansenula polymorpha*

QIAN Wei-dong et al (School of Life Science and Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an Shaanxi 710021)

Abstract [Objective] In order to improve the production of D-arabitol by *Hansenula polymorpha*. [Method] Orthogonal array design method was used to optimize the best components of the fermentation medium, then combined the effects of temperature on D-arabitol yield and cell biomass, a method for changing the temperature was established. [Result] The results showed that: the optimal fermentation medium compositions were as follows: glucose 200 g/L, peptone 20 g/L, yeast extract 12 g/L, Triton X-100 10 g/L, ammonium sulfate 3.0 g/L, magnesium sulfate heptahydrate 2.5 g/L, potassium dihydrogen phosphate 2.5 g/L; The optimal growth temperature of *Hansenula polymorpha* DL-1 was 37 ℃, whereas the optimal biosynthesis temperature of D-arabitol was 34 ℃; The three-stage temperature-shift method was as follow: firstly, *Hansenula polymorpha* DL-1 was cultured in 37 ℃ for 24 h, then cultured in 48 ℃ for another 24 h, and finally further cultured in 34 ℃ for 96 h. The results showed that the yield of D-arabitol was 114.92 g/L, which increased 30.25%, 208.66% and 20.93% than constant temperature of 37 ℃, 48 ℃ and 34 ℃, respectively. [Conclusion] The three-stage temperature control method could be used to increase D-arabitol production.

Key words D-arabitol; *Hansenula polymorpha* DL-1; Orthogonal test; Temperature-shift

D-阿拉伯糖醇是一种五碳多元糖醇,在机体内的代谢与胰岛素无关,是一种重要的功能性食品基料^[1]。目前的主要生产方法有提取法、化学合成法及生物法^[2]。

生物法具有成本低,易于操作,节能环保等特点。发酵法生产 D-阿拉伯糖醇常用的菌株一般都是耐高渗酵母。耐高渗酵母在高渗环境中能够代谢产生多元糖醇,保护高渗条件下的细胞^[3]。目前用于生产 D-阿拉伯糖醇的主要菌株有汉逊酵母属(*Hansenula*)^[4]、毕赤酵母属(*Pichia*)^[5]、假丝酵母属(*Candida*)^[6]、接合酵母属(*Zygosaccharomyces*)^[7]、德巴利氏酵母属(*Debaryomyces*)^[8]。宋卫斌^[9]从花粉中筛选获得了 1 株 D-阿拉伯糖醇产量为 86.55 g/L 的高产菌株,分析鉴定属于假丝酵母属。唐晓芳等^[10]对 *Hansenula anomala* 转化葡萄糖生产 D-阿拉伯糖醇的反应条件进行了研究,在最佳工艺条件下 D-阿拉伯糖醇浓度为 245.97 g/L,转化率为 0.49 g D-阿拉伯糖醇/g 葡萄糖。李泽^[11]从高渗环境中筛选出 1 株 D-阿拉伯糖醇的高产菌株,并对发酵工艺进行优化,在最佳工艺条件下进行发酵,D-阿拉伯糖醇的产量能达到 60.6 g/L,葡萄糖转化率为 26.11%。蔡利等^[12]从高糖环境中筛选出一株 D-阿拉伯糖醇产量为 54.65 g/L 的高产菌株,命名为 *Ko-*

damaea ohmeri NH-9。尤翠萍等^[13]研究了表面活性剂对得巴利汉逊酵母发酵生产 D-阿拉伯糖醇的影响,结果发现, Triton X-100 对 D-阿拉伯糖醇的生产具有显著的促进作用。

汉逊酵母属中的多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)是当前国际公认的理想细胞工厂之一^[14]。多形汉逊酵母 DL-1 是一种耐热酵母(可在 49 ℃条件下正常生长),培养温度较高,细胞生长代谢速度较快,相对较高的培养温度有利于降低冷却成本和大规模培养时的污染可能性。多形汉逊酵母可以在廉价的非选择性培养基中生长,易于高密度发酵,具有广泛的研究价值。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种。多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*, *H. polymorpha*) DL-1 (ATCC No. 26012) 菌株,由中国科学院微生物研究所邱并生研究员惠赠,陕西科技大学制药工程实验室保藏。

1.1.2 培养基。斜面培养基:葡萄糖 20 g/L,酵母浸粉 10 g/L,蛋白胨 20 g/L,琼脂 15 g/L, pH 6.0。

种子培养基:葡萄糖 20 g/L,酵母浸粉 10 g/L,蛋白胨 20 g/L, pH 6.0。

高渗固体培养基:葡萄糖 500 g/L,酵母浸粉 10 g/L,蛋白胨 20 g/L,琼脂 15 g/L, pH 6.0。

1.2 试验方法

1.2.1 培养方法。

1.2.1.1 菌株预培养。将斜面保藏的种子在 37 ℃活化 3 h 后,挑取一个单菌落接种至装有 5 ml 种子培养基的试管,37

基金项目 国家自然科学基金项目“利用超远缘遗传转化酵母技术解析龙胆苦苷生物合成关键酶基因”(31100040);陕西省教育厅项目“利用酵母全合成抗癌药物紫杉醇的研究(2013-JK0727)”。

作者简介 钱卫东(1980-),男,安徽芜湖人,讲师,博士,从事功能性酵母开发方面的研究。

收稿日期 2014-07-10

℃、160 r/min,振荡培养 24 h 得种子液。将培养好的种子液涂布于葡萄糖含量为 500 g/L 的高渗固体培养基,置于 37 ℃ 恒温培养 48 h;挑取生长较好的单菌落接种至种子培养基中进行种子培养,37 ℃、160 r/min,振荡培养 24 h 得种子液。重复此步骤驯化 3 次后,挑选生长较大的单菌落涂布在高渗固体斜面保藏。

1.2.1.2 种子培养。将驯化后的种子在 37 ℃ 活化 3 h 后,挑取一个单菌落接种至装有 100 ml 种子培养基的 250 ml 三角瓶中进行种子培养,37 ℃、160 r/min,振荡培养 24 h 得种

子液。

1.2.1.3 发酵培养基优化。以葡萄糖、蛋白胨、酵母浸粉、Triton X-100、硫酸铵、七水硫酸镁、磷酸二氢钾的添加量为考察因素,根据文献报道设置不同水平,运用正交试验确定最佳发酵培养基配方。在温度 37 ℃、接种菌龄 24 h、接种量 5%、摇床转速 160 r/min、发酵时间 144 h 的条件下,进行 7 因素 3 水平正交试验设计,具体设计见表 1。发酵结果经极差和方差分析,找出各培养基成分的最佳浓度。

表 1 正交试验设计

水平	因素							g/L
	葡萄糖(A)	蛋白胨(B)	酵母浸粉(C)	Triton X-100(D)	硫酸铵(E)	七水硫酸镁(F)	磷酸二氢钾(G)	
1	150	18	8	6	3.0	2.5	2.5	
2	200	20	10	10	3.5	3.0	3.0	
3	250	22	12	14	4.0	3.5	3.5	

1.2.1.4 变温发酵培养。将发酵培养基在 37 ℃、160 r/min 培养 24 h 后,升温到 48 ℃ 继续培养 24 h,再降温到 34 ℃ 继续培养 96 h 得发酵液,每隔 24 h 取样分析。每组试验设计 3 组平行对照,取试验结果的平均值。

1.2.2 分析测定方法。

1.2.2.1 细胞干重测定。将 10 ml 发酵液 8 000 r/min 离心 10 min 后用蒸馏水洗涤 2 次得到的细胞在 80 ℃ 下烘至恒重,称重。

1.2.2.2 D-阿拉伯糖醇产量和葡萄糖残留量的测定。取新鲜发酵液 50 ml,8 000 r/min 离心 10 min,取上清,用微孔滤膜过滤。检测条件:色谱柱 SH1011;柱温 50 ℃;进样量 5 μl;流动相 0.01 mol/L H₂SO₄;流速 0.8 ml/min;示差检测器,根据保留时间分析 D-阿拉伯糖醇产物和葡萄糖底物的浓度。

2 结果与分析

2.1 发酵培养基优化 发酵培养基优化分析结果见表 2 和 3。由表 2 可知,各因素的极差顺序为 $R_A > R_D > R_B > R_F > R_C > R_G > R_E$,极差 R 值越大,其对 D-阿拉伯糖醇产率影响越大。因此,影响因子的先后顺序为:葡萄糖 > Triton X-100 > 蛋白胨 > 七水硫酸镁 > 酵母浸粉 > 磷酸二氢钾 > 硫酸铵。方差分析结果进一步表明,A(葡萄糖)和 D(Triton X-100)对 D-阿拉伯糖醇的产率有显著影响。用多形汉逊酵母 DL-1 发酵生产 D-阿拉伯糖醇的最佳发酵培养基配方为 A₂B₂C₃D₂E₁F₁G₁,即葡萄糖 200 g/L,蛋白胨 20 g/L,酵母浸粉 12 g/L,聚乙二醇辛基苯基醚 10 g/L,硫酸铵 3.0 g/L,七水硫酸镁 2.5 g/L,磷酸二氢钾 2.5 g/L;依照此发酵培养基配方进行发酵验证试验,D-阿拉伯糖醇产率可达 91.46 g/L。

2.2 温度对 D-阿拉伯糖醇产量的影响

2.2.1 恒温发酵。温度是影响微生物细胞生长以及代谢产物合成的一个重要因素。在发酵前期,温度通过影响培养基的性质进而影响微生物菌体自身的生长;在发酵中后期,温度通过影响目标产物生物合成关键酶的活性进而调控代谢产物的合成。因此在发酵培养过程中,必须保证合适的温

度。多形汉逊酵母 DL-1 的最适生长温度是 37 ~ 43 ℃,最高生长温度可达 49 ℃。设置不同温度(30、34、37、40、44、48 ℃)条件下恒温发酵 144 h,每隔 8 h 取样测定菌体生物量及 D-阿拉伯糖醇产量,以期获得该菌最适的发酵温度,结果见图 1。

表 2 正交试验结果

试验号	A	B	C	D	E	F	G	D-阿拉伯糖醇产量/g/L
1	1	1	1	1	1	1	1	60.31
2	1	2	2	2	2	2	2	67.47
3	1	3	3	3	3	3	3	61.72
4	2	1	1	2	2	3	3	84.94
5	2	2	2	3	3	1	1	89.30
6	2	3	3	1	1	2	2	85.26
7	3	1	2	1	3	2	3	83.47
8	3	2	3	2	1	3	1	88.51
9	3	3	1	3	2	1	2	82.50
10	1	1	3	3	2	2	1	65.38
11	1	2	1	1	3	3	2	61.02
12	1	3	2	2	1	1	3	66.73
13	2	1	2	3	1	3	2	86.41
14	2	2	3	1	2	1	3	88.29
15	2	3	1	2	3	2	1	89.94
16	3	1	3	2	3	1	2	86.72
17	3	2	1	3	1	2	3	85.91
18	3	3	2	1	2	3	1	81.28
k_1	63.438	77.705	77.270	76.605	78.855	78.975	78.787	
k_2	87.190	79.417	78.777	79.885	77.810	78.905	77.563	
k_3	84.398	77.905	78.980	78.537	78.362	77.147	78.677	
R	23.752	1.712	1.710	3.280	1.045	1.828	1.224	

从图 1 可以看出,温度对菌体生物量及 D-阿拉伯糖醇含量有明显的影 响。由图 1a 可知,培养温度为 37 ℃ 时,细胞生长速率显著增大,40 h 菌体开始进入稳定期,细胞干重(DCW)达到最大值(5.32 g/L);当培养温度为 48 ℃ 时,细胞生长缓慢,延滞期较长。由图 1b 可知,培养温度为 34 ℃ 时,D-阿拉伯糖醇生成速率最大,发酵结束后 D-阿拉伯糖醇总量

达到 95.03 g/L。

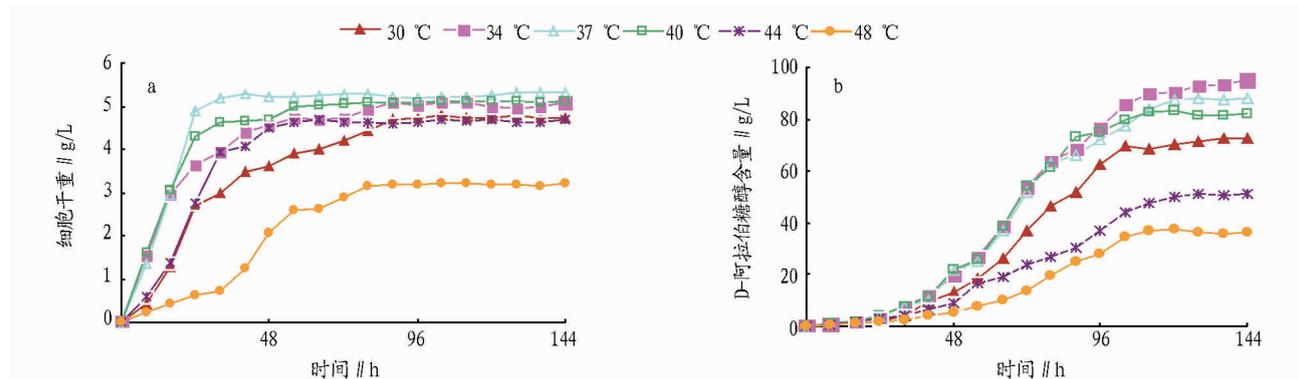


图1 温度对菌体生物量和D-阿拉伯糖醇产量的影响

2.2.2 变温发酵。从上述试验可以看出,多形汉逊酵母DL-1发酵生产D-阿拉伯糖醇过程中,菌体生长和D-阿拉伯糖醇生产的最适温度不同。同时,D-阿拉伯糖醇是一种多元糖醇,在抵御高温条件引起的刺激中起着非常重要的作用。因此该试验运用变温控制以满足细胞生长、D-阿拉伯糖醇合成以及产生的D-阿拉伯糖醇保护机体自身的作用3方面的要求,以提高细胞反应过程中目标产物的量,结果见图2。

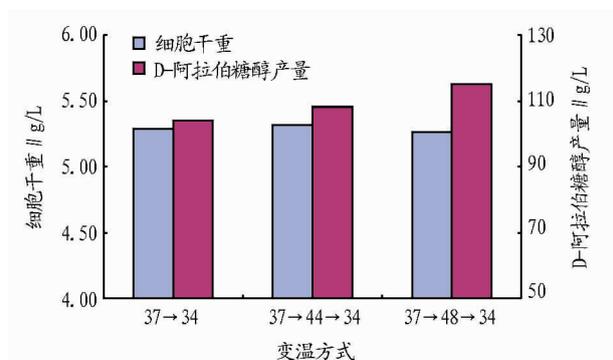


图2 变温调控对D-阿拉伯糖醇产量和菌体生物量的影响

由图2可知,37 °C发酵培养24 h后,升温到48 °C继续培养24 h,再降温至34 °C继续发酵96 h,细胞干重和D-阿拉伯糖醇产量分别为5.26 g/L和114.92 g/L。细胞干重相比37 °C(5.32 g/L)和34 °C(5.09 g/L)变化不明显;但相比于48 °C恒温发酵(3.21 g/L)提高了2.09倍。D-阿拉伯糖醇产量相比37 °C恒温发酵(88.23 g/L)、48 °C恒温发酵(37.23 g/L)和34 °C恒温发酵(95.03 g/L)分别提高了30.25%、208.66%、20.93%。这表明,变温发酵培养可以影响菌体细胞的生长和代谢产物的生成,适时的高温刺激可以促使菌体大量合成D-阿拉伯糖醇,以应对外界不良环境的变化,达到自我保护的目的。

3 结论

通过对多形汉逊酵母DL-1发酵生产D-阿拉伯糖醇过程的初步研究,根据温度对微生物细胞生长和产物代谢过程

的影响,结合细胞生长的最适温度、产物生成的最适温度以及发酵培养基组分的影响,获得了一种提高多形汉逊酵母DL-1发酵生产D-阿拉伯糖醇产量的方法,采用该方法发酵结束后细胞干重和D-阿拉伯糖醇产量分别为5.26 g/L和114.92 g/L。D-阿拉伯糖醇产量分别比恒温发酵(37、48、34 °C)提高了30.25%、208.66%、20.93%;细胞干重相比37 °C恒温发酵和34 °C恒温发酵变化不明显,相比于48 °C恒温发酵提高了2.09倍。该研究提供的方法为利用多形汉逊酵母DL-1发酵生产D-阿拉伯糖醇提供实践依据。

参考文献

- [1] 金树人,李瑛,夏桂珍,等.糖醇生产技术与应用[M].北京:中国轻工业出版社,2008.
- [2] JAVIER ESCALANTE, GLORIA CAMINAL, MARTA FIGUEREDO, et al. Production of Arabitol from Glucose by *Hansenula polymorpha*[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1990, 70(4): 228-231.
- [3] TOKUOKA K. Sugar- and salt-tolerant yeasts[J]. The Journal of Applied Bacteriology, 1993, 74: 101-110.
- [4] ESCALANTE J, CAMINAL G, FIGUEREDO M, et al. Production of arbutol from glucose by *Hansenula Polymorpha*[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1990, 70: 228-231.
- [5] FUJIWARA A, MASUDA S. Process for Producing D-arabitol; US, 4271268 [P]. 1981.
- [6] BERNARD E M, CHRISTIANSEN K J, TSANG S F, et al. Rate of Arabinol Production by pathogenic yeast species[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1981, 14: 189-194.
- [7] ONISHI H, SUZUKI T. Microbial Production of xylitol from glucose[J]. Applied Microbiology, 1969, 18(6): 1031-1035.
- [8] SAHA B C, SAKAKIBARA Y. Production of D-arabitol by a newly isolated *Zygosaccharomyces rouxii*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2007, 34: 519-523.
- [9] 宋卫斌. D-阿拉伯糖生产菌的选育、工艺优化及其关键酶基因的克隆、表达[D].杭州:浙江大学, 2011.
- [10] 唐晓芳, 张国栋, 王刚. *Hansenula anomala* 转化葡萄糖生产阿拉伯糖醇的研究[J]. 食品工业科技, 2012(1): 314-317.
- [11] 李泽. 产D-阿拉伯糖酵母菌株的筛选及发酵条件研究[D]. 济南: 山东轻工业学院, 2012.
- [12] 蔡莉, 张扬, 朱宏阳, 等. 一株产D-阿拉伯糖醇的菌株的分离筛选及鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(1): 23-26.
- [13] 尤翠萍, 张梁, 丁重阳, 等. 表面活性剂对D-阿拉伯糖醇发酵的影响[J]. 生物加工过程, 2011, 9(2): 18-22.
- [14] GELLISSSEN G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts[J]. Applied Microbiol Botechnol, 2000, 54: 741-750.