

玉米浆在产甘油假丝酵母甘油发酵中的作用机理

谢 涛 方慧英 诸葛健*

(江南大学工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214036)

摘要: 以复合培养基和合成培养基进行比较发酵,研究了玉米浆在产甘油假丝酵母甘油发酵过程中的作用机理。结果表明:玉米浆中的磷、氮和微量元素是影响产甘油假丝酵母甘油发酵的 3 个关键因素。当玉米浆磷浓度为 121.75mg/L (玉米浆浓度为 14g/L),最大甘油转化率达到 53.44%。玉米浆磷可以调节 EMP 途径与 HMP 途径之间碳架代谢流的分布,随着玉米浆浓度进一步增加,过量磷能抑制 HMP 途径而激活 EMP 途径,因而复合培养基各项发酵参数的变化非常显著。玉米浆氮对磷的调节功能有协同作用,但并不是产甘油假丝酵母甘油发酵的理想氮源。玉米浆中的微量元素能够显著提高葡萄糖的消耗速率、促进菌体的生长和增加甘油的产量。

关键词: 玉米浆, 产甘油假丝酵母, 甘油发酵, 作用机理

中图分类号: TQ92 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 04-0080-05

Mechanism of Corn Steep Liquor during Glycerol Fermentation by *Candida glycerinogenes*

XIE Tao FANG Hui-Ying ZHUGE Jian*

(The Key Lab of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036)

Abstract: Using chemically defined medium as the control, mechanism of corn steep liquor (CSL) in complex medium during glycerol production by *Candida glycerinogenes* was studied. The results showed that there were three key factors in CSL that had some great influences on glycerol fermentation of *C. glycerinogenes*, including phosphorus, nitrogen, and trace elements. The maximum glycerol yield of 53.44% was achieved at an optimal phosphorus concentration of 121.75mg/L, where the CSL concentration was 14g/L. Phosphorus in CSL could control the distribution of carbon metabolism flux between EMP pathway and HMP pathway. With the increase in CSL concentrations, superfluous phosphorus could restrain HMP pathway and activate EMP pathway, thus resulting in remarkable changes in various fermentation parameters of complex medium. Nitrogen in CSL could play a cooperative role in the regulative function of phosphorus. However, it was not a suitable nitrogen source for *C. glycerinogenes*. Trace elements in CSL could markedly improve the glucose consumption rate, accelerate the cell growth, and enhance the glycerol yield.

Key words: Corn steep liquor (CSL), *Candida glycerinogenes*, Glycerol fermentation, Mechanism

玉米浆 (CSL) 是玉米淀粉等产品加工过程中的浸泡水经浓缩至含固形物 70% 左右后得到的副产品^[1], 其构成成分较复杂, 其中蛋白质含量高达 40% 以上 (按干基计), 氨基酸、生物素和维生素 (如烟酸等) 含量较丰富^[2]。玉米浆作为一种较好的微生物生长或代谢产物合成的促进剂已广泛应用于酶制剂、抗生素、生化药物等众多发酵产品的生产过程^[3-6]。甘油是一种重要的轻化工原料, 广泛应用于化妆品、牙膏、烟草、香精、水性油墨、印染纺织、涂料、合成树脂、皮革、造纸、制药、食品和国

* 通讯作者 Tel: 0510-5874341, E-mail: jzhuge@sohu.com

收稿日期: 2005-11-03, 修回日期: 2005-12-08

防等各个领域的 1,700 多种产品,采用耐高渗酵母发酵生产甘油具有广阔的前景^[7]。耐高渗透压酵母 *Candida glycerinogenes* 发酵生产甘油具有高产量、高转化率和高回收率等优点,在我国得到了较好的工业化应用^[8]。目前,本研究中心已对 *C. glycerinogenes* 的生理特性、生产工艺和菌种选育等进行了较为全面的研究,发现发酵培养基中玉米浆的含量是影响甘油生产过程的一个重要营养因子^[8-10]。但是,对玉米浆影响 *C. glycerinogenes* 产甘油发酵过程的作用机理至今尚未进行深入探讨。本文以合成培养基作对比,研究玉米浆中各类成分对 *C. glycerinogenes* 甘油发酵的影响,探究其作用机理。

1 材料与方 法

1.1 菌株和培养基

菌株: *Candida glycerinogenes* 由江南大学发酵甘油研究设计中心提供。

种子培养基:葡萄糖 100g, 尿素 2g, CSL 8g, 定容至 1L, 自然 pH 值。

复合发酵培养基:葡萄糖 210~230g, 尿素 2g, CSL 10~18g/L, 定容至 1L, 自然 pH 值。

合成发酵培养基:葡萄糖 210~230g, 尿素 2g, KH_2PO_4 0.40~0.73g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, CaCl_2 0.1g, NaCl 0.1g, 微量元素溶液 1mL/L, 定容至 1L, 自然 pH。

微量元素溶液:参见文献 [11]。

1.2 发酵方法

从刚转接培养好的新鲜斜面上挑取一环菌株,接入 500mL 摇瓶中(种子培养基装液量为 50mL),于往复式摇床 30℃ 振荡培养 19h(振幅 10cm, 频率 110 次/min)。再按 5% 的接种量将摇瓶种子液接入 5L 发酵罐(韩国 Co. Ltd, KF-5L),发酵培养液装液量为 3L,转速为 550r/min,温度为 30℃,通气量为 3L/min,自然 pH。

1.3 测定方法

干物质、灰分和总氮测定:分别采用烘干法、灼烧法和微量凯氏定氮法。

pH 值测定:PHS-3C 酸度计测定。

磷、金属元素和氨基酸测定:分别采用钼蓝比色法、氢火焰原子吸收光谱法和 HPLC 分析法。

甘油、生物量和残糖测定:参见文献 [11]。

2 结果与讨论

2.1 玉米浆组分的测定

为了研究玉米浆在 *C. glycerinogenes* 产甘油发酵过程的作用机理,首先对玉米浆中的主要成分进行了分析,见表 1。

表 1 玉米浆的主要组分及含量

组分	含量/(g/100g)	组分	含量/(g/100g)	组分	含量/(g/100g)
干物质	42.87	Na	5.91×10^{-2}	Aspartic acid	0.34
灰分	6.87	Mn	1.13×10^{-3}	Serine	0.45
总氮	3.19	K	2.06	Glycine	0.39
pH 值	4.68	Ileucine	0.45	Alanine	1.45

续表 1

P	0.92	Glutamic acid	0.33	Tyrosine	0.10
Zn	7.33×10^{-3}	Histidine	0.52	Valine	0.69
Fe	4.54×10^{-2}	Threonine	0.44	Phenylalanine	0.59
Cu	4.52×10^{-4}	Arginine	0.04	Leucine	1.32
Ca	0.52	Cysteine	0.03	Proline	0.62
Mg	0.41	Methionine	0.40	Lysine	0.37

2.2 采用复合培养基与合成培养基的分批发酵过程

复合发酵培养基中玉米浆浓度设定为 10、12、14、16 和 18 g · L⁻¹ (磷浓度分别为 86.79、105.03、121.75、139.96 和 158.31 mg · L⁻¹)，对应实验批次表示为 B₁₁、B₁₂、B₁₃、B₁₄ 和 B₁₅；而合成发酵培养基中 KH₂PO₄ 浓度设定为 0.40、0.49、0.57、0.65 和 0.73 g · L⁻¹ (磷浓度依次为 87.49、105.49、122.42、140.45 和 158.10 mg · L⁻¹)，同样相应实验批次为 B₂₁、B₂₂、B₂₃、B₂₄ 和 B₂₅。在 5 L 自动控制发酵罐中进行分批发酵，实验结果见图 1 和表 2。从图 1、表 2 可知，当采用含 CSL 的复合培养基进行发酵时，随着其浓度增加，各种发酵参数的变化要剧烈得多。

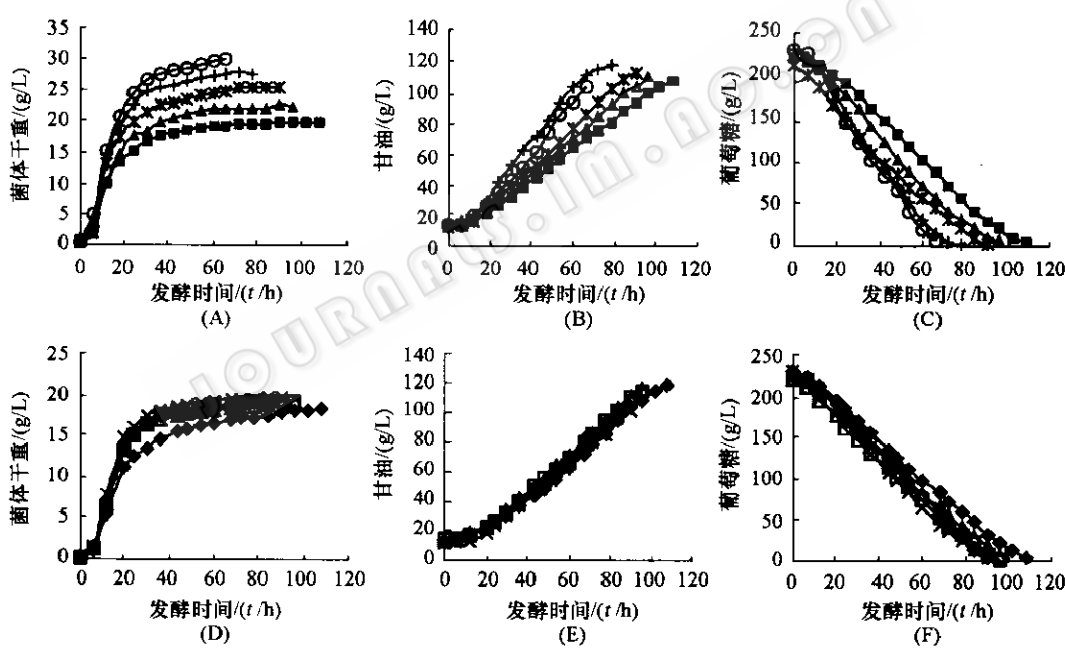


图 1 不同浓度玉米浆和磷酸二氢钾条件下的发酵过程

CSL: A、B、C, KH₂PO₄: D、E、F

■— B₁₁, ▲— B₁₂, *— B₁₃, — B₁₄, -○- B₁₅, ◆— B₂₁, -□- B₂₂, -△- B₂₃, -◇- B₂₄, ×— B₂₅

表 2 不同浓度玉米浆和磷酸二氢钾对甘油生产的影响

发酵参数	B ₁₁	B ₁₂	B ₁₃	B ₁₄	B ₁₅	B ₂₁	B ₂₂	B ₂₃	B ₂₄	B ₂₅
初始葡萄糖浓度/(g/L)	220	220	210	230	230	230	220	220	230	230
发酵周期/(h)	108	96	90	78	72	108	96	90	84	84
最大菌体干重/(g/L)	19.9	22.5	25.5	27.8	30.1	18.3	19.0	19.4	19.6	19.7
最大甘油产量/(g/L)	107	109	112	112	98	119	115	116	108	97
甘油对葡萄糖的转化率/(%)	48.6	49.3	53.4	48.6	42.4	51.8	52.2	52.8	46.9	42.2

续表 2

葡萄糖消耗速率/[g/(L·h)]	1.99	2.23	2.39	2.92	3.16	2.08	2.26	2.21	2.50	2.50
菌体生产强度/[g/(L·h)]	0.18	0.23	0.28	0.39	0.43	0.17	0.20	0.22	0.23	0.23
甘油生产强度/[g/(L·h)]	0.99	1.13	1.25	1.43	1.36	1.10	1.20	1.29	1.28	1.16
胞内甘油/(mg/g 干菌体)	32.8	37.3	45.4	28.6	16.7	58.7	62.6	69.4	50.8	42.5
胞内总磷/(mg/g 干菌体)	0.37	0.56	0.69	0.85	1.04	2.32	2.41	2.49	2.98	3.86

2.3 玉米浆主要组分对 *C. glycerinogenes* 甘油发酵的影响

2.3.1 玉米浆磷对甘油发酵的影响：研究表明，在 *C. glycerinogenes* 甘油发酵过程中，磷源的消耗主要发生在指数生长的前期和中期，发酵进行至指数生长末期时培养基中的磷已降至 2mg/L 以下。这是由于在指数生长前期和中期，酵母细胞快速分裂和增殖，需要大量磷用于细胞的合成代谢，如合成核酸、磷脂等重要组分。

王正祥等^[9]研究认为，在 *C. glycerinogenes* 发酵过程中，通过 EMP 途径和 HMP 途径的混合途径合成甘油；其中 HMP 途径具有双重功能，不仅能产生大量 NADPH，为细胞的各种生理代谢提供还原力；还能将 1 mol 葡萄糖-6-磷酸转化为 2/3 mol 果糖-6-磷酸和 1/3 mol 甘油醛-3-磷酸，回流至 EMP 途径和甘油合成途径。另据文献报道^[14]，磷酸盐可以调节 EMP 途径和 HMP 途径之间碳架代谢流的分布，过量磷酸盐可以抑制 HMP 途径而激活 EMP 途径。由图 1 和表 2 可知，无论复合培养基或合成培养基，甘油对葡萄糖的转化率取得最大值时所对应的初始磷浓度相当一致，约在 122mg/L 左右。当培养基中磷浓度高于最适浓度时，若保持尿素浓度不变，随着 KH_2PO_4 浓度增加，生物量、葡萄糖消耗速率和发酵周期等并未出现显著变化，而胞外甘油转化率与胞内甘油积累量逐渐下降，胞内磷积累加剧；这说明氮源不足时，过量磷酸盐可抑制 HMP 途径，但对 EMP 途径的激活作用受到限制。同样，在复合培养基中，随着玉米浆浓度增加，磷源与氮源（尿素与玉米浆氮之和）浓度都增加，此时过量磷对 HMP 途径与 EMP 途径的调节功能充分发挥作用，HMP 途径受到抑制而 EMP 途径被强化，表现在葡萄糖消耗速率显著加快、生物量迅速增加和发酵周期大大缩短，从而甘油转化率急剧下降，胞内磷积累量较之合成培养基明显减少。

2.3.2 玉米浆氮对甘油发酵的影响：由于复合培养基和合成培养基中尿素浓度始终保持在 2g/L。当培养基中磷浓度相同时，对合成培养基发酵所产生的生物量做出贡献的氮源只有尿素，而复合培养基发酵所产生的生物量则是尿素和玉米浆氮共同作用的结果。那么，表 2 中后者与前者所产生的生物量之差（ ΔDCW ）是不是玉米浆氮作用的结果呢？在保持磷浓度相对应前提下，复合培养基中不加尿素进行发酵，这样发酵终止时菌体干重（DCW）仅是玉米浆氮作用的结果（见图 2）。

由图 2 可知，当培养基中磷浓度小于 69.21mg/L 时， ΔDCW 值趋向于零，反之则 ΔDCW 值不断增大。当培养基中磷浓度大于 122mg/L 时，不加尿素的复合培养基发酵后产生的 DCW 与 ΔDCW 相差无几，这证明 ΔDCW 的确是由玉米浆氮作用所引起的。而当培养基中磷浓度小于 122mg/L 时，不加尿素的复合培养基发酵后产生的 DCW 却与 ΔDCW 相差较大。这是由于随着磷浓度逐渐减少，复合培养基与合成培养基中均出现磷缺乏，菌体生长受到抑制， ΔDCW 也随之减小。由图 2 还可计算得出，当玉米浆氮单

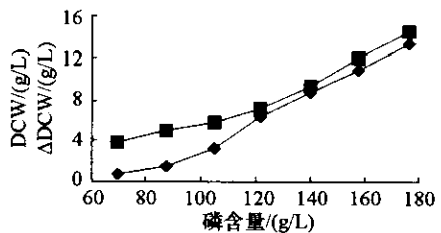


图 2 玉米浆氮对菌体生长的影响
—◆— ΔDCW ，—■— DCW

独作为氮源用于发酵时,菌体对玉米浆氮的平均得率为16.87g/g;而当玉米浆氮与尿素一起作为氮源时,菌体对玉米浆氮的平均得率仅为10.98g/g。这表明,当玉米浆氮与尿素共存时,*C. glycerinogenes* 优先利用尿素作为氮源。

2.3.3 玉米浆中的微量元素对甘油发酵的影响:为了考察玉米浆中微量元素对*C. glycerinogenes* 发酵生产甘油的影响,设计了一个基础培养基,它除了没有添加微量元素溶液之外,其余营养成分均与B₂₃相同,其发酵结果见图3。当发酵至96h时,残余葡萄糖浓度高达32.5g/L,最大生物、最大甘油产量和甘油转化率分别为15.54g/L、88.53g/L和40.24%,且分别比B₂₃的发酵结果低了18.88%、23.75%和23.73%。这说明添加微量元素溶液后能够显著提高生物量、甘油产量和转化率,还能提高葡萄糖的消耗速率,缩短发酵周期,而这几方面的发酵结果B₂₃与B₁₃已相差无几(见表2)。因此,玉米浆中微量元素的存在,对于提高葡萄糖消耗速率、缩短发酵周期、增加生物量以及维持较高的甘油生产水平也是非常重要的。

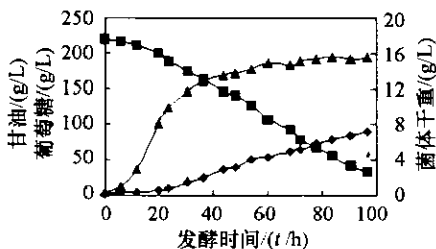


图3 不添加微量元素的合成培养基的发酵过程

▲ 菌体干重, ◆ 甘油, ■ 葡萄糖

3 结论

以复合培养基和合成培养基进行比较发酵,结果表明,玉米浆中的磷、氮和微量元素是影响*C. glycerinogenes* 甘油发酵的关键成分。无论复合培养基或合成培养基,最大甘油转化率所对应的初始磷浓度约在122 mg·L⁻¹左右。玉米浆磷可以调节EMP途径与HMP途径之间碳架代谢流的分布,但其调节作用受氮源浓度的限制。当氮源不足时,过量的磷能抑制HMP途径,而对EMP途径的激活作用受阻;当氮源充足时,能够显著促进EMP途径。表现在:当磷浓度高于最适浓度时,随着其浓度增加,复合培养基的各项发酵指标较之合成培养基的变化要剧烈得多。随着EMP途径被激活,菌体生长代谢旺盛,玉米浆氮也作为氮源被利用,但玉米浆氮并不是一种合适的氮源。玉米浆中的微量元素也能够显著提高葡萄糖的消耗速率、促进菌体生长和增加甘油产量。

参考文献

- [1] 尤新. 玉米新加工技术. 北京: 中国轻工业出版社, 1999. 35~36.
- [2] Akhtar M, Lentz M J, Blanchette R A. Biotech, 1997, **80** (6): 161~164.
- [3] Witjitra K, Shah M M, Cheryan M. Enzyme Microbial Tech, 1996, **19**: 322~327.
- [4] Kona R P, Qureshi N, Pai J S. Bioresource Tech, 2001, **78**: 123~126.
- [5] Lee P C, Lee W G, Lee S Y. Biotechnol Bioprocess Eng, 2000, **5**: 379~381.
- [6] Akhtar M, Lentz M J, Blanchette R A, et al. Biotech, 1997, **80** (6): 161~164.
- [7] Mohammad J, Taherzadeh L A, Gunnar L. Enzyme Microb Technol, 2002, **31** (1): 53~66.
- [8] Zhuge J, Fang H Y, Wang Z X. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, **55**: 686~692.
- [9] Wang Z X, Zhuge J, Prior B A. Biotechnol Adv, 2001, **19**: 210~223.
- [10] 郭雪娜, 诸葛斌, 邱重晏, 等. 无锡轻工大学学报, 2002, **21** (4): 336~339.
- [11] 谢涛, 方慧英, 诸葛健. 化工学报, 2005, **56** (12): 67~73.
- [12] Shi X L, Yang L Y, Niu X J, et al. Microbiological Research, 2003, **158** (4): 345~351.
- [13] Chen P S, Toribara T Y, Warner H. Anal Chem, 1956, **28**: 1756~1758.
- [14] 张嗣良, 储炬. 多尺度微生物过程优化. 北京: 化学工业出版社, 2004. 143~145.