

尖孢镰刀菌发酵生产木糖醇的工艺研究

刘森¹, 杨涛², 崔薇薇²

(1. 沈阳农业大学土地与环境学院, 辽宁 沈阳 110161) (2. 辽宁省农业科学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 木糖醇是一种功能性甜味剂。本文研究了不同发酵温度、pH、装液量、接种量、转速等对尖孢镰刀菌 (*Fusarium xyloporum*) 发酵木糖的影响。结果表明: *F. xyloporum* 有较强的转化木糖的能力。在温度 28~30 °C, 初始 pH 5.0~6.0, 装液量 50%, 接种量 10%, 转速 160 r/min 的优化条件下, 在含木糖 10 g/L 培养液中添加 1% 甲醇时, 木糖转化为木糖醇的产率为 3.81%, 表明用丝状真菌发酵产木糖醇是一条新的途径。

关键词: 尖孢镰刀菌; 木糖醇; 发酵

中图分类号: TQ920.6; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)04-0347-03

Study on the Xylitol Production via Fermentation by *Fusarium Xyloporum*

LIU Sen¹, YANG Tao², CUI Wei-wei²

(1.College of Soil and Environment, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

(2.Liaoning Academy of Agricultural Science, Shenyang 110161, China)

Abstract: Fermentation conditions for xylitol production by *Fusarium xyloporum* were optimized. The results showed that the optimal temperature, pH, liquid volume, inoculum size, shaking speed and methanol content in 10 g/L xylose-containing medium were 28~30 °C, 5.0~6.0, 50%, 10%, 160 r/min and 1%, respectively, under which the conversion rate of xylose was 3.81%. This research provided a novel route for xylitol production by *Fusarium xyloporum*.

Key words: *Fusarium xyloporum*; xylitol; fermentation

木糖醇^[1]是一种天然甜味剂, 甜度高, 具有抗龋齿、代谢不依赖胰岛素和降低转氨酶等功能, 具有较高的商业价值。20 世纪 80 年代以来有关酵母菌发酵木糖生产木糖醇的研究日益增多^[2], 目前利用微生物发酵产木糖醇的研究多集中在酵母菌, 对以丝状真菌发酵的研究报道的较少。本文以尖孢镰刀菌为研究对象, 对影响木糖发酵的有关条件如: 发酵温度、pH、装液量、接种量、转速等进行了研究。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

菌种: *Fusarium xyloporum* 本实验室选育, 保藏。

斜面培养基 (g/L): 马铃薯泥 200, 蔗糖 20, 琼脂 20, 用双蒸水定容至 1 L, 调 pH 至 5.0。

种子培养基 (g/L): KH₂PO₄ 2, MgSO₄ 0.3, CaCl₂ 0.3, 蛋白胨 5, 酵母浸膏 3, 麦芽汁 3 mL, FeSO₄·7H₂O 0.005, MnSO₄·4H₂O 0.0016, 用双蒸水定容至 1 L, 调 pH 至 5.0。

生长培养基 (g/L): 木糖 10, KH₂PO₄ 2, MgSO₄ 0.3, CaCl₂ 0.002, 蛋白胨 5, 酵母膏 3, 麦芽汁 3 mL,

FeSO₄·7H₂O 0.005, MnSO₄·4H₂O 0.0016, 用双蒸水定容至 1 L, 调 pH 至 5.0

主要试剂: 葡萄糖, 东北制药厂一分厂; 酵母膏, 北京奥博星生物技术有限公司; 琼脂, 北京奥博星生物技术有限公司; 蛋白胨, 北京奥博星生物技术有限公司; 木糖, 天津化学试剂公司; 木糖醇, 国药集团化学试剂有限公司; 其余试剂为市售 CP 级。

1.2 方法

1.2.1 液体种子培养

将斜面菌种 1 环接入液体种子培养基中, 250 mL 三角瓶装液量 100 mL, 于 30 °C, 摇床转速 200 r/min 培养 24 h。

1.2.2 摇瓶发酵

250 mL 三角瓶加入 100 mL 培养基, 按体积比 1:10 的比例接入 10 mL 菌种, 180 r/min, 30 °C 发酵。

1.2.3 分析方法

D-木糖含量测定^[3]: 取适量稀释样品 1 mL, 加地衣酚试剂 3 mL, 混匀, 沸水浴反应 30 min, 冷却, 于 660 nm 波长测光吸收值, 由在同样条件下测得的标准样品直线方程求得。

木糖醇含量测定^[4]: 取适当稀释样品 0.5 mL, 加

收稿日期: 2008-01-04

高碘酸试剂 0.5 mL, 混匀, 加变色酸试剂 5 mL, 振荡, 沸水浴 30 min, 冷却, 于 570 nm 波长测光吸收值, 由在同样条件下测得的标准样品直线方程求得。

菌体量测定^[5]: 取 10 mL 发酵液, 2500 r/min 离心 10 min 去上清液。剩余菌体用去离子水洗涤, 重新离心, 重复 2 次。于 120 °C 干燥 24 h 称重。

2 结果与讨论

2.1 发酵温度对木糖醇产量的影响

将种子培养液接种于装有 100 mL 生长培养基的 250 mL 三角瓶中, 分别用 26 °C、28 °C、30 °C、32 °C、34 °C、36 °C 摇床培养, 转速 180 r/min。发酵到第 5 天取样, 取样量为 1 mL。测定木糖醇的产量, 结果如表 1。

表 1 发酵温度对木糖醇产量的的影响

Table 1 Effects of fermentation temperature on the yields of xylitol

温度/°C	26	28	30	32	34	36
产率/(g/L)	0.246	0.294	0.295	0.251	0.223	0.207

从表 1 知 28~30 °C 为适宜的发酵温度。对于 *F. xyloporum*, 当培养温度从 26 °C 上升到 36 °C, 菌体的生长逐步增加随后又逐渐减少。可能温度过高影响了菌体的代谢, 导致菌体代谢木糖产木糖醇的能力降低。

2.2 pH 对转化率的影响

以 NaOH、HCl 调节培养基的初始 pH 值分别为 3、4、5、6、7 和 8。使用 250 mL 三角瓶, 30 °C, 180 r/min 进行培养, 到第 5 天取样, 取样量 1 mL。测定木糖醇的产量, 结果如表 2。

表 2 初始 pH 对转化率的影响

Table 2 Effects of initial pH on the conversion rate

pH	3	4	5	6	7	8
产率/(g/L)	0.213	0.237	0.288	0.296	0.249	0.201

从表 2 知 pH 5.0~6.0 之间为适宜的发酵初始 pH, 可获得大量的木糖醇和真菌菌丝体。当 pH 上升到 8.0 时, 木糖醇的转化率下降明显, 说明发酵生产木糖醇适合在酸性条件下进行。最适 pH 与酵母的比较接近, 如 *P.tannophilus* 的最适 pH 在 2.5~5.0 之间^[6,7]; 树干毕赤酵母 (*Pichia stipitis*) 的 pH 在 4.0~5.5 之间; 休哈塔丝酵母 (*Candida shehatae*) 的 pH 在 3.5~5.5^[8]。

2.3 装液量对木糖发酵的影响

实验中采用 250 mL 三角瓶, 装液量分别为 20%、30%、40%、50%、60%, 30 °C, 180 r/min 摇床培养, 到第 5 天取样, 取样量 1 mL。测定木糖醇的产量, 结果如表 3。

表 3 装液量对转化率的影响

Table 3 Effects of liquid volume in flask on the conversion rate

装液量/%	20	30	40	50	60
产率/(g/L)	0.126	0.174	0.243	0.276	0.258

从表 3 知 50% 的装液量时, 木糖醇的产量达到一个最高值, 相对得率 2.76%。有文献报道, 随着溶氧的减少, 木糖醇的产量增加。已在很多木糖醇生产酵母中发现较低的通气更利于木糖醇的生成^[9]。在装液量 50% 以下为好氧条件, 木糖大部分用于菌体生长, 木糖醇积累较少。

在转速固定的情况下, 决定发酵液中溶氧浓度的是摇瓶的装液量。本试验表明, 在 250 mL 的三角瓶中, 随着培养基的逐渐增加, 木糖醇的产量达到最大时又有所下降, 这表明溶氧的减少有一个最低值。

2.4 接种量对转化率的影响

在 100 mL 发酵培养基中分别接入 5 mL、10 mL、15 mL 和 20 mL 液体种子, 30 °C, 180 r/min 摇床培养, 到第 5 d 取样, 取样量 1 mL。测定木糖醇的产量, 结果如表 4。

表 4 接种量对转化率的影响

Table 4 Effects of initial pH on the conversion rate

接种量/%	5	10	15	20
产率/(g/L)	0.207	0.286	0.229	0.194

从表 4 知 10% 左右的接种量比较理想。接种量必须适中, 接种量过小, *F. xyloporum* 发酵时间会延长, 木糖醇的得率下降; 接种量过大, 则在发酵初期会消耗过多的产物, 反而不利于木糖醇的积累。

2.5 转速对转化率的影响

250 mL 三角瓶装 100 mL 生长培养基, 接种量为 10%, 30 °C, 如表 5 的摇床转速培养, 到第 5 d 取样, 取样量 1 mL。测定木糖醇的产量, 结果如表 5。

表 5 不同转速对发酵转化率的影响

Table 5 Effects of inoculum size on the conversion rate

转速/(r/min)	100	120	140	160	180	200
产率/(g/L)	0.213	0.239	0.257	0.298	0.264	0.248

从表 5 知转速在 160 r/min 下最有利于木糖转化。在厌氧条件或者低通气率条件下, 依赖于 NAD⁺ 的木糖醇脱氢酶明显受到抑制, 这将有利于木糖醇的积累。但是, 限氧也有一定的范围, 维持一定的氧浓度对于 *F. xyloporum* 转化木糖是必要的。

2.6 甲醇对转化率的影响

(下转第 342 页)