

产木糖醇菌株的筛选及发酵条件优化

赵寿经, 侯 琨, 梁彦龙, 徐立新, 钱廷春

(吉林大学 生物与农业工程学院, 长春 130022)

摘要:从玉米芯中筛选到1株高效转化D-木糖为木糖醇的酵母菌株e。经形态学鉴定及26S rDNA D1/D2区序列分析,将菌株e鉴定为 *Trichosporon coremii forme*(丝孢酵母)。采用单因素及正交试验优化设计研究了发酵法生产木糖醇的工艺,结果表明:酵母菌株e发酵法生产木糖醇的工艺参数为:碳源质量浓度为40 g/l,氮源质量浓度为6 g/l,起始pH为7,接种量为6%。

关键词:生物工程;木糖醇;生物转化法;丝孢酵母

中图分类号:Q815 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-5497(2010)03-0868-05

Screening of xylitol-producing strain and optimization of its fermentation conditions

ZHAO Shou-jing, HOU Kun, LIANG Yan-long, XU Li-xin, QIAN Yan-chun

(College of Biological and Agricultural Engineering, Jilin University, Changchun 130022, China)

Abstract: A yeast, which can perform biotransformation from xylose to xylitol, was isolated from corncob and was identified as *trichosporon coremii forme* by morphological identification and 26S rDNA D1/D2 domain sequence analysis. Besides, the optimal fermentation conditions were determined through single factor test and orthogonal experiment. The optimal conditions are as follows, carbon source concentration: 40g/l, nitrogen source concentration: 6g/l, initial pH: 7.0 and inoculum size: 6%.

Key words: bioengineering; xylitol; biotransformation; *trichosporon coremii forme*

传统的木糖醇生产方法是采用化学催化加氢法,该法生产成本高,对环境污染严重^[1]。生物转化法一直被认为是一条更为经济的工艺路线,因为发酵生产木糖醇无需木糖纯化步骤,还可以简化木糖醇的分离过程^[2]。酵母细胞转化木糖的过程耗能较低,在木糖醇发酵过程中可获得高浓度产物^[3]。因此,获得性能优异的产木糖醇菌株是发酵指标达到令人满意水平的基础。作者从玉米芯中筛选获得了一株产木糖醇的酵母菌株e,对

其进行了分析鉴定,并着重开展了发酵条件研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试样为玉米芯。培养基包括:①YEPD培养基(g/l):葡萄糖20,蛋白胨20,酵母粉10;②YX培养基(g/l):D-木糖20,蛋白胨20,酵母粉10;③发酵培养基(g/l):D-木糖40,蛋白胨1.5,酵母粉1.5。

收稿日期:2009-01-13.

基金项目:吉林省科技发展计划项目(20060546).

作者简介:赵寿经(1961-),男,教授,博士生导师.研究方向:生物工程. E-mail:swgc@jlu.edu.cn

1.2 试验方法

1.2.1 分离与筛选

参照文献[4-5]的分离方法,将玉米芯粉碎,称取 5 g 加到含 150 ml 无菌生理盐水的三角瓶中,在 26 °C 下,150 r/min 振荡培养 8 h;稀释悬液,选择合适的稀释度,分别涂布于 YX 平板培养基上,26 °C 培养 3~4 d,观察菌落生长情况,并将新长出的形态上有差异的单菌落挑出。挑取生长快速的典型单菌落在 YX 固体斜面上划线,4 °C 保存。

单菌落种子培养采用 YEPD 培养基,26 °C,100 r/min 培养 24 h,测量细胞生长情况,将菌液 1245 g 离心 15 min,并用灭菌蒸馏水洗涤一次,将收集到的细胞在 28 °C、100 r/min 条件下转化 10% 的木糖溶液。定时取样分析各菌株木糖醇产生情况。

1.2.2 分类鉴定

(1) 菌种形态学特征

菌种形态特征鉴定按照文献[6]的方法进行。

(2) 分子特征

基因组 DNA 提取方法参照文献[7]。26S rDNA D1/D2 区序列扩增引物由大连宝生物工程有限公司合成。正向引物 NL-1: 5'-GCATATCAATAAGCG GAGGAAAAG-3',反向引物 NL-4:5'-GGTCCGTG TTTCAAGACGG-3'。

PCR 扩增反应条件:94 °C、2 min,94 °C、30 s,56 °C、30 s,72 °C、80 s;34 次循环;4 °C 保存。

将 PCR 产物电泳检测后直接送至大连宝生物工程有限公司进行测序,结果在 GenBank 数据库中进行同源序列搜索(BLAST),比较供试菌株与已知酵母菌相应序列的同源性。为进一步显示实验菌株与已知酵母菌的亲缘关系及分类地位,根据同源序列搜索结果,下载相似性较高的酵母菌菌种的 26S rDNA D1/D2 区序列,采用 DNAMAN 软件进行分析,完全匹配排列(align),然后用 Neighbor-Joining 分析方法^[8]进行分子系统学分析,并进行 1000 次 Bootstrap 统计学检验,Phylogenetic tree 显示系统发育树^[9]。

1.2.3 发酵条件的优化

在酵母发酵木糖生产木糖醇的过程中,对发酵效率有影响的因素碳源质量浓度、氮源质量浓度、起始 pH、温度、接种量、装液量等进行单因素优化试验,在此基础上,对发酵效率影响较大的因素,包括碳源质量浓度(A),氮源质量浓度(B),起

始 pH 值(C)及接种量(D)进行 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,以木糖醇转化率为指标优化发酵条件。250 ml 摇瓶装液后于 150 r/min、26 °C 发酵 4 d。

2 结果与分析

2.1 筛选结果

从玉米芯中筛选出 36 株能够以木糖作为唯一 C 源生长的菌种。比较生长特性,选取 10 株快速利用木糖的菌种进行复筛。结果由图 1 可知,菌株 e 的木糖醇产率最高,木糖醇转化率达到 18%,选择其进行后续研究。

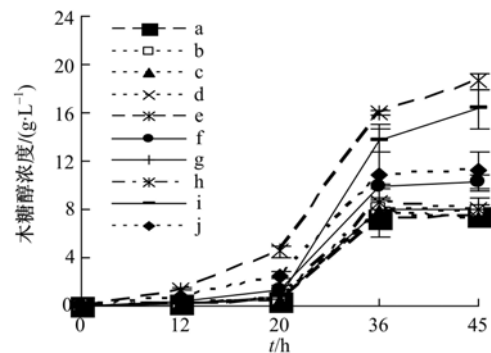


图 1 不同菌株产木糖醇能力比较

Fig.1 Comparison of producing xylitol among different strains

2.2 菌种鉴定

2.2.1 形态学特征

菌种 e 有典型的酵母菌落形态,细胞短卵形至球形,无子囊孢子,在加盖玻片的玉米粉琼脂培养基上形成大量假菌丝,如图 2 所示。

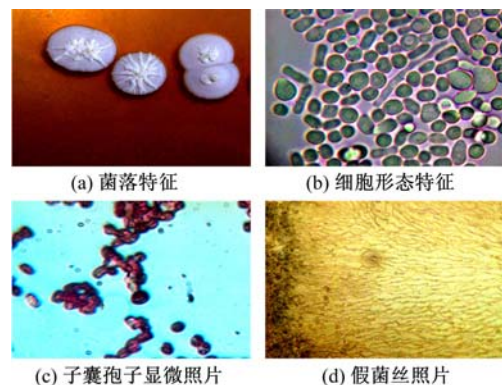


图 2 菌种 e 的形态学特征

Fig.2 Shape of strain e

2.2.2 分子生物学特征

对核酸序列数据库进行同源序列搜索的结果表明,菌株 e 的 D1/D2 序列与数据库中已有的 (*Trichosporon coremiforme*) 序列号为

AF189863.1 的核酸序列的相似性达到了 99%。构建的系统发育树如图 3 所示。结果表明,菌株 e 的分类地位应属 *Trichosporon coremiiforme*。它的 rDNA 基因中 D1/D2 的核苷酸序列在 GenBank 的登记号为 FJ491404。

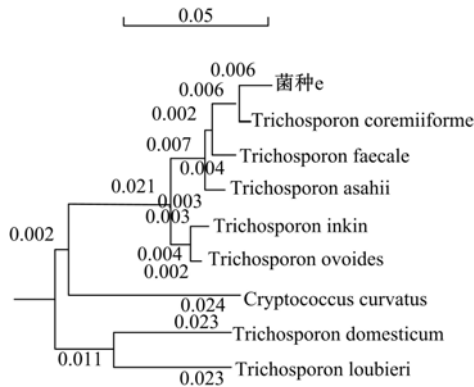


图 3 DNAMAN 软件绘制系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree drawn by DNAMAN

2.3 发酵试验数据分析

2.3.1 碳源质量浓度对发酵效果的影响

实验中取碳源质量浓度为 2、10、20、40、60 g/l,氮源质量浓度为 3 g/l(酵母膏:蛋白胨为 1:1),初始 pH 为 6,接入 8% 的种子,装液量 50 ml,转速 150 r/min,26 °C 发酵 4 d。碳源质量浓度对木糖醇产量的影响结果如图 4 所示。

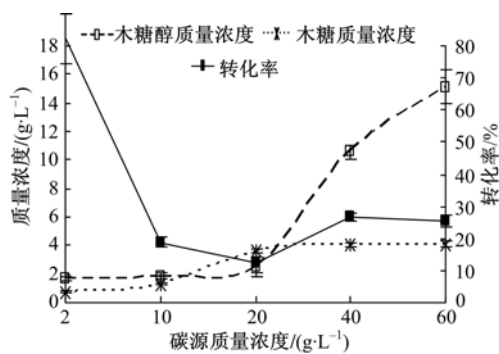


图 4 碳源浓度对发酵效果的影响

Fig. 4 Effect of carbon source concentration on fermentation

由图 4 可见,低碳源质量浓度下木糖醇转化率较高,但木糖醇得率较少,随着初始碳源质量浓度的增高,出现了底物抑制,木糖醇得率提高,但转化率降低,因此选取 40 g/l 的初始碳源质量浓度为益。

2.3.2 氮源质量浓度对发酵效果的影响

为了确定理想的氮源质量浓度,取氮源质量浓度分别为 0、3、6、9 g/l(酵母膏:蛋白胨为

1:1),碳源浓度为 40 g/l,在其他条件不变的前提下进行发酵试验,结果如图 5 所示。

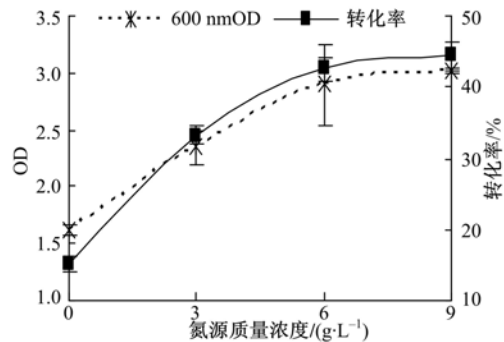


图 5 氮源浓度对发酵效果的影响

Fig. 5 Effect of nitrogen source concentration on fermentation

由图 5 可见,氮源质量浓度对转化率影响很大,氮源质量浓度低于 6 g/l 时,菌体明显生长不足,且木糖醇转化率较低,而大于 6 g/l 的源质量浓度对发酵影响不大,考虑到成本问题,选用 6 g/l 的氮源质量浓度较好。

2.3.3 起始 pH 对发酵效果的影响

在其他条件不变的前提下,取初始 pH 分别为 4、5、6、7、8 进行发酵实验,结果如图 6 所示。

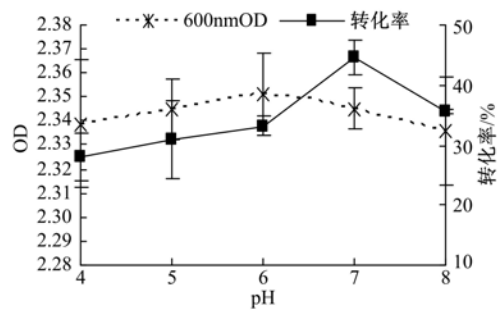


图 6 起始 pH 对发酵效果的影响

Fig. 6 Effect of initial pH on fermentation

由图 6 可见,pH 对木糖醇产率的影响较大,其中菌株 e 的最适生长 pH 值为 6,菌株 e 的最适产醇 pH 值为 7。

2.3.4 温度对发酵效果的影响

其他条件不变,取温度分别为 25、29、33、37、41 °C 进行发酵实验,结果如图 7 所示。

由图 7 可知,温度对发酵的影响很大,当温度小于 37 °C 时,随着温度的升高,木糖醇的得率也不断提高,木糖醇的得率在 37 °C 时达到最大,此时,菌体浓度也达最大,而当温度大于 37 °C 时,随着温度的升高菌体浓度降低,转化率也降低,因此,选取在 37 °C 下发酵为益。

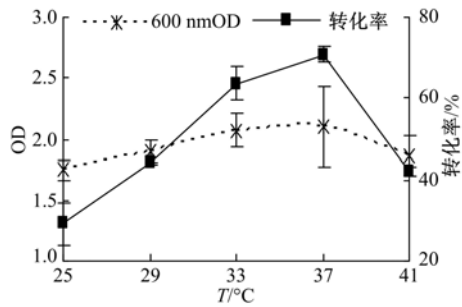


图 7 温度对菌体发酵的影响

Fig.7 Effect of temperature on fermentation

2.3.5 接种量对发酵效果的影响

接种量是影响发酵水平的重要因素,接种量过小影响发酵时间,过大则会消耗过多底物用于菌体生长,不利于木糖醇的积累,所以,在其他条件不变的前提下,取 4%、6%、8%、10%、12% 的液体种子接入装有 50 ml 发酵培养基的 250 ml 三角瓶中。发酵结果如图 8 所示。

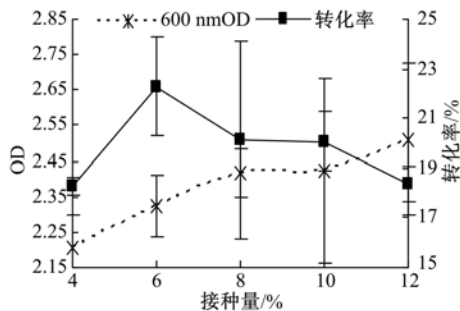


图 8 接种量对发酵效果的影响

Fig.8 Effect of inoculate on fermentation

从图 8 可以看出,当接种量为 6% 时,木糖醇转化率最高,达到 22.3%,而接种量过高和过低都导致转化率的下降,所以选取接种量为 6% 为宜。

2.3.6 装液量对发酵效果的影响

在转速一定的情况下,培养基中溶氧量主要取决于摇瓶装液量。在保持其他条件一定的前提下,在 250 ml 的摇瓶中按 20、40、60、80、100、120 ml 的装液量进行发酵,摇床转速为 150 r/min,发酵结果如图 9 所示。

2.3.7 正交试验结果

在单因素试验基础上,对影响木糖醇转化率较大的因素如:碳源质量浓度(A)、氮源浓度(B)、初始 pH(C)、接种量(D)进行 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,并对试验结果进行分析(如表 1 所示)。

从表 1 可以看出:在正交试验所选条件范围

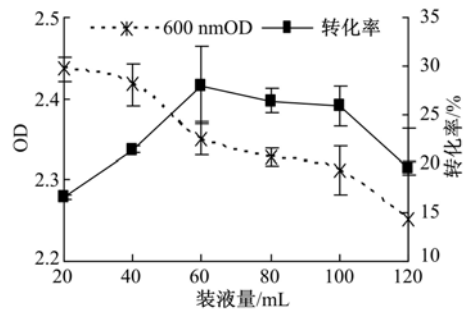


图 9 装液量对发酵效果的影响

Fig.9 Effect of culture volume on fermentation

内,4 个因素对木糖醇转化率影响的顺序为: B(氮源质量浓度) > C(pH) > A(碳源质量浓度) > D(接种量)。获得最佳工艺条件为:碳源浓度为 40 g/l,氮源质量浓度为 6 g/l,pH 为 7,接种量为 6%。经过验证实验证实,在此最佳工艺条件下木糖醇转化率达 69.1%。与国内外已发现的木糖醇转化率的对比结果见表 2。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验设计方案及结果

Table 1 $L_9(3^4)$ orthogonal test and result

试验号	A/(g · l ⁻¹)	B/(g · l ⁻¹)	C	D/%	转化率/%
1	20	3	6	4	38.61
2	20	6	7	6	57.82
3	20	9	8	8	48.86
4	40	3	7	8	48.15
5	40	6	8	4	53.74
6	40	9	6	6	61.15
7	60	3	8	6	38.62
8	60	6	6	8	56.08
9	60	9	7	4	59.94
R ₁	48.430	41.793	51.947	50.763	
R ₂	54.347	55.880	55.303	52.530	
R ₃	51.547	56.650	47.073	51.030	
R	5.917	14.857	8.230	1.767	
优水平	A ₂ B ₂ C ₂ D ₂				
主次因素	B, C, A, D				
最佳组合	A ₂ B ₂ C ₂ D ₂				

表 2 已发现的木糖醇转化率对比结果

Table 2 Comparison of some found xylitol conversions

菌株名称	转化率/%	参考文献
<i>C. tropicalis</i> CICM Y0092	70	[12]
<i>Trichosporon coremii forme</i>	69.1	本试验
<i>Hansenula anomala</i> UN89	67.9	[13]
<i>Candida tropicalis</i> ASZ. 1776	66.35	[14]
<i>Candida guilliermondii</i> FTI20037	65	[15]

3 结 论

(1)木糖醇最佳发酵条件为:碳源质量浓度 40 g/l,氮源质量浓度 6 g/l,pH 为 7,接种量 6%,

装液量 60 ml, 37 °C 下发酵 4 d, 最大转化率达到 69.1%。经优化设计使木糖醇转化率比初始时提高了 51.1%。

(2) 筛选获得的菌株 *Trichosporon coremii forme* 可以高效利用木糖, 在初始碳源质量浓度为 40 g/l 的条件下, 木糖醇转化率达到 69.1%, 与国内外用于木糖醇发酵的酵母菌株相比, 转化率没有显著差别^[10-11]。但是在低碳源浓度下, *Trichosporon coremii forme* 具有特别高的转化率, 而玉米芯、秸秆等农作物初步降解后单糖浓度较低, 所以 *Trichosporon coremii forme* 更适于玉米芯、秸秆等农作物初步降解物的生物转化, 在废物综合利用与环保方面有重要意义^[12-13]。

参考文献:

- [1] 王关斌, 赵光辉. 木糖醇的生产与发展趋势[J]. 浙江化工, 2005, 36(2): 25-26.
Wang Guan-bin, Zhao Guang-hui. The production and development trend of xylitol [J]. Zhejiang Chemical Industry, 2005, 36(2): 25-26.
- [2] Parajó J C, Dominguez H, Dominguez J M. Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis[J]. Bioresource Technology, 1998, 65(3): 191-201.
- [3] Kim T B, Lee Y J, Kim P, et al. Increased xylitol production rate during long-term cell recycle fermentation of *Candida tropicalis*[J]. Biotechnology Letters, 2004, 26(8): 623-627.
- [4] 赵寿经, 黄丽, 王辉, 等. 利用发酵法和酶法综合技术改进玉米淀粉生产湿法浸泡工艺[J]. 吉林大学学报:工学版, 2008, 38(6): 1489-1494.
Zhao Shou-jing, Huang Li, Wang Hui, et al. Improvement on corn starch wet-steeping process by microbiology fermentation and enzyme[J]. Journal of Jilin University Engineering and Technology Edition, 2008, 38(6): 1489-1494.
- [5] 赵寿经, 孙莉莉, 钱延春, 等. 利用蛋白酶发酵液替代 SO₂ 改进玉米淀粉生产浸泡工艺研究[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(10): 76-80.
Zhao Shou-jing, Sun Li-li, Qian Yan-chun, et al. Use of protease fermentation liquid to substitute SO₂ in corn wet-milling process[J]. Food and Fermentation Industry, 2007, 33(10): 76-80.
- [6] 张纪忠. 微生物分类学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1990: 415-416.
- [7] 白逢彦, 贾建华, 梁慧燕. 假丝酵母属疑难菌株大亚基 rDNA D1/D2 区域序列分析及其分类学意义[J]. 菌物系统, 2002, 21(1): 27-32.
Bai Feng-yan, Jia Jian-hua, Liang Hui-yan. Molecular taxonomic study on the problematic *Candida* strains based on 26S rDNA D1/D2 domain sequence comparison[J]. Mycosystema, 2002, 21(1): 27-32.
- [8] Atteson K. The performance of neighbor-joining methods of phylogenetic reconstruction[J]. Algorithmica, 1999, 25(2-3): 251-278.
- [9] 李金霞, 刘光全, 程池. 酿酒酵母 26S rDNA 区域序列分析及其系统发育研究[J]. 酿酒, 2007, 34(1): 37-39.
Li Jin-xia, Liu Guang-quan, Cheng Chi. The identification of *Saccharomyces cerevisiae* by sequence analysis of 26S rDNA D1/D2 domain gene[J]. Liquor Making, 2007, 34(1): 37-39.
- [10] 张凌燕, 张梁, 王正祥, 等. 一株高效利用木糖的酵母菌的分离及鉴定[J]. 生物加工过程, 2008, 6(4): 56-60.
Zhang Ling-yan, Zhang Liang, Wang Zheng-xiang, et al. Isolation and identification of one yeast strain with high xylose-utilizing efficiency [J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2008, 6(4): 56-60.
- [11] 王步江. 微生物转化木糖生产木糖醇的初步研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2005.
Wang Bu-jiang. Primary studies on microbial conversion xylose for xylitol production[D]. Yangling: Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, 2005.
- [12] 董丽辉. 固定化细胞生物转化半纤维素水解液生产木糖醇[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2004.
Dong Li-hui. Production of xylitol from hemicellulose hydrolysate by immobilized cells [D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2004.
- [13] Silva C J S M, Mussatto S I, Roberto I C. Study of xylitol production by *Candida guilliermondii* on a bench bioreactor[J]. Journal of Food Engineering, 2006, 75(1): 115-119.