

不同发酵条件下产甘油假丝酵母有机酸代谢的研究*

金海如 诸葛健

(江南大学教育部工业生物技术重点实验室 无锡 214036)

摘 要:产甘油假丝酵母(*Candida glycerolgenesis*)发酵产生的有机酸对丙三醇产品质量和产率均有影响。发现在发酵其它条件恒定,装液比和玉米浆浓度增加时,发酵液总酸是递增的。在装液比为 0.2 和玉米浆浓度为 8g/L 时,丙酮酸和乳酸在细胞生长期可分别积累达 4.1g/L 和 1.0g/L,比正常发酵时增加 2 倍以上,丙三醇产率也低;然而,装液比为 0.08 和玉米浆浓度为 4g/L 时,丙酮酸和乳酸产生较低,丙三醇产率较高,但乙酸积累比供氧不足时高,可达 2.6g/L。发酵过程中有机酸被细胞代谢,含量逐渐下降,如在初糖浓度为 100g/L 时,有机酸在细胞生长期积累至高峰后,丙三醇和有机酸随之均降低至较低含量,并且丙酮酸或乳酸可以转化为乙酸。此外,在外加一些添加剂时对其产生有机酸也有影响,如添加 1% 油酸和 V_B 可以降低乙酸的积累,同时增加丙酮酸的含量,丙三醇产量也有所增加;而丙酮酸结构类似物氟代丙酮酸和亚硫酸盐促进乙酸的产生,使酮戊二酸合成减少,丙三醇产量约增加 20%。

关键词:有机酸, 丙三醇, 产甘油假丝酵母

中图分类号:TQ223.16 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2001) 06-0704-05

发酵过程中形成的有机酸是伴随微生物生长及其代谢活动而产生的,如啤酒、葡萄酒、醋等发酵产品中存在的有机酸^[1~2],赋予产品的口感和风味。而在其它一些发酵产品中,有机酸的存在就影响了产品的提取和产品的质量。产甘油假丝酵母是性能优良的丙三醇生产菌株,成功地用于工业化生产^[3~4]。但发酵过程有机酸的形成如乙酸等对丙三醇生产是不利的^[5],一方面可能导致糖转化率的下降,另一方面与丙三醇产品中含量较高的脂肪酸及脂肪酸酯的形成有相关性。为此,曾对产甘油假丝酵母丙三醇发酵过程产生的有机酸种类和变化进行了研究^[6],同时通过进一步研究不同发酵条件下产生的有机酸种类及其含量将不仅有助于了解丙三醇发酵的代谢背景,也有利于进一步代谢控制某些有机酸的产生,将对产品质量控制和产率的提高有其重要意义。

1 材料和方法

1.1 菌种和培养基

1.1.1 菌株:产甘油假丝酵母(*Candida glycerolgenesis*)无锡轻工大学发酵甘油研究设计中心保存。

1.1.2 种子培养基:葡萄糖 100.0g,玉米浆 10.0g,尿素 2.0g,定容至 1L。

1.1.3 发酵培养基:葡萄糖 100.0~250.0g,玉米浆 2.0~8.0g,尿素 2.0g,定容至 1L,按实

* 国家“九五”科技攻关项目(96-C03-03-03)

作者简介:金海如(1970-),男,浙江省东阳市人,江南大学博士,主要从事微生物工程及代谢工程的研究。

收稿日期:2000-12-25,修回日期:2001-06-11

验需要加入氟代丙酮酸 3.0mg/L,亚硫酸盐 50.0g/L。合成培养基略^[7],按实验需要加油酸 10.0g/L, V_{B1} 1.0g/L。

1.1.4 高效液相色谱:采用 Alltech 426 HPLC pump, ChromTek™ 色谱数据系统 (American Sage Inc.), Linear™ UVIS 200 检测器。0.22μm 微孔滤膜和 0.45μm 混合纤维素酯微孔膜来自上海半岛实业有限公司净化器材厂。

1.1.5 有机酸标准液:标准有机酸溶液采用超纯水配制,0.22μm 微孔滤膜过滤后备用。标准有机酸包括苹果酸、乳酸、乙酸、酮戊二酸及丙酮酸,皆为分析纯。超纯水来自无锡华晶电子集团公司。

1.2 方法

1.2.1 培养条件:将斜面种子一环置于 250mL 的三角瓶中,在 30℃ 下振荡培养 20h。在 250mL 的三角瓶中按实验需要装入发酵培养基,按 5% 的种子培养液,在 30℃ 旋转式摇床振荡培养,发酵温度 30℃,HYG-II 回转式恒温摇瓶柜转速 250r/min。

1.2.2 HPLC 分析发酵样品:首先离心去作酵母细胞,用 0.45μm 混合纤维素酯微孔膜过滤,再 20μL 样品进样。Alltech IC Wescan Anion Exclusion Column 柱子,Particle Size 10μm, 300mm × 7.8mm,进样量 20μL,UV210nm,流动相 1mmol/L H₂SO₄,流速 1.0mL/min,温度室温。

1.2.3 总酸测定:见文献[6]。

1.2.4 丙三醇测定:变色酸比色法*。

2 结果

2.1 不同发酵环境下对产丙三醇假丝酵母总酸形成的影响

产甘油假丝酵母在高渗透压环境下生长时产生了较多种类和数量的有机酸;有机酸的形成表现为生长过程 pH 的急剧下降。不同发酵条件下产生的有机酸对最终 pH 值的差别不大,但形成总酸的量是不同的,如图 1 所示,在发酵 24h 时装液比越大,总酸形成越多。不同玉米浆添加量对总酸形成的影响如图 2 所示。在发酵 24h 时玉米浆添加越多,细胞密度越高,总酸形成越高。因此,发酵液中总酸的含量一方面决定于玉米浆添加数量的多少,即细胞密度的大小,另一方面决定于供氧的大小。

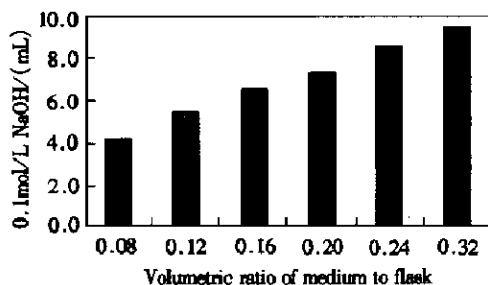


图 1 不同装液比时产丙三醇假丝酵母产生的总酸

Fig.1 The total acidity in *C. glycerolgenesis* fermentation medium under different volumetric ratios of medium to flask

2.2 不同发酵条件下有机酸形成的变化

产丙三醇假丝酵母在发酵过程中代谢产生了一些有机酸,引起发酵液 pH 下降,其中发酵液中有有机酸有乙酸、丙酮酸、乳酸和酮戊二酸等^[5]。这些有机酸在不同发酵条件下的代谢变化如图 3 ~ 图 6。如图 3 所示,发酵条件为装液量 20mL/250mL、玉米浆 4g/L、尿素

* 见发酵法甘油分析试验方法,无锡轻工大学发酵甘油研究设计中心,1995 年

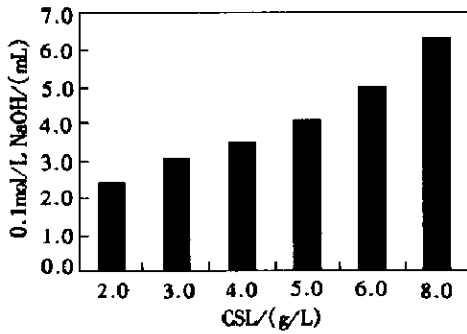


图2 不同玉米浆时产丙三醇假丝酵母产生的总酸

Fig.2 The total acidity in *C. glycerolgenesis* fermentation medium under different concentration of CSL added

2g/L、葡萄糖 300g/L 时产丙三醇假丝酵母的有机酸代谢曲线(图 4~图 6 以图 3 作为对照),丙酮酸随发酵时间延长逐渐下降,在 60h 乙酸含量达到最高,随后又下降,酮戊二酸随发酵时间增加有所增加,这说明发酵过程中丙酮酸可以继续被利用转化为乙酸或酮戊二酸。图 4 所示,为装液量 50mL/250mL(其它条件同图 3 样品)时有机酸产生的变化曲线,发现丙酮酸产生的数量最高,达 4.1g/L,其次乳酸含量在 1.0g/L 左右,其它有机酸都低于 1.0g/L,其中丙酮酸随着发酵时间延长含量有所下降。

如图 5 所示,玉米浆 8.0g/L 时(其它条件如图 3 样品)大量产生丙酮酸和乳酸,分别为 4.1g/L 和 1.6g/L,但在发酵后期丙酮酸、乳酸和乙酸含量都

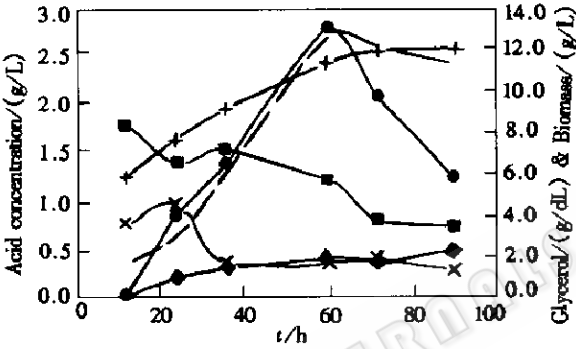


图3 装液量为 20mL 时产丙三醇假丝酵母有机酸变化曲线

Fig.3 Pattern of accumulation of organic acids in *C. glycerolgenesis* with 20mL medium in 250mL flask

—◆— 2-Ketoglutarate; —■— Pyruvate; —x— Lactate; —●— Acetate; — — Glycerol; —+— Biomass.

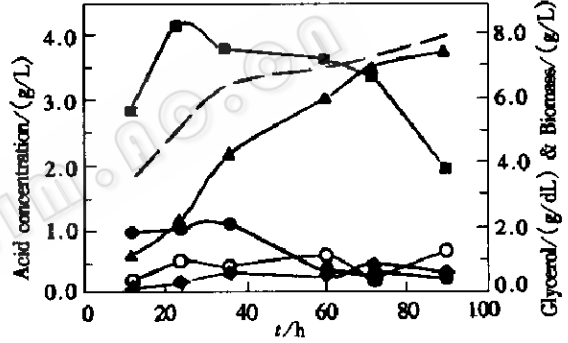


图4 装液量为 50mL/250mL 时产丙三醇假丝酵母有机酸变化曲线

Fig.4 Pattern of accumulation of organic acids in *C. glycerolgenesis* with 50mL medium in 250mL flask

—◆— 2-Ketoglutarate; —■— Pyruvate; —●— Lactate; —○— Acetate; —▲— Glycerol; — — Biomass.

下降至较低水平,而酮戊二酸含量在发酵过程是增加的,达到 1.0g/L,这说明丙酮酸、乳酸和乙酸可以被菌体继续利用。图 6 为初糖 100g/L 时有机酸的变化,发现丙酮酸随发酵时间增加逐渐下降,进一步说明丙酮酸是可以被利用的,其它有机酸在 24h 时达到最高值,随后又逐渐降低,在 72h 降至极低水平。

2.3 添加剂对 *C. glycerolgenesis* 有机酸形成的影响

在外加一些添加剂时,其产生有机酸的情况见表 1。添加油酸与对照相比,乙酸和丙酮酸的产生有所减少,这可能是添加的油酸直接被细胞所利用,减少了细胞中心代谢中构成细胞所需的中间代谢物及能量的合成,同时也相应提高丙三醇的产率。添加 V_{B1} 使乙酸形成的量比对照低,但酮戊二酸产生较多,这可能是 TCA 循环较活泼的原因。当加入丙酮酸的结构类似物氟代丙酮酸后,酮戊二酸和丙酮酸含量减少,乙酸有增加;加入亚硫

酸盐时,乙酸有较大量的形成,其他有机酸含量下降,同时也提高了丙三醇的产量约 20%。

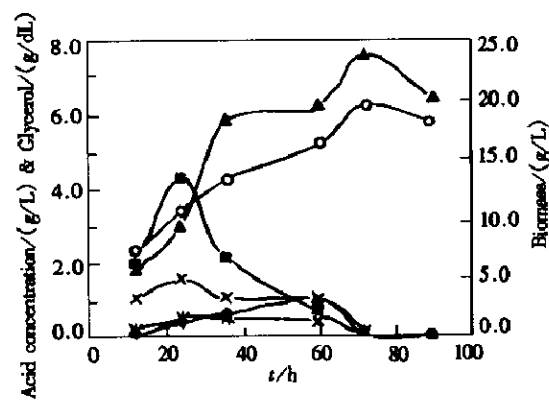


图 5 产丙三醇假丝酵母玉米浆 8g/L 时有机酸的变化曲线

Fig.5 Pattern of accumulation of organic acids in *C. glycerolgenesis* with 8.0g/L CSL in fermentation

—◆— 2-Ketoglutarate; —■— Pyruvate; —×— Lactate; —*— Acetate; —▲— Glycerol; - - - Biomass.

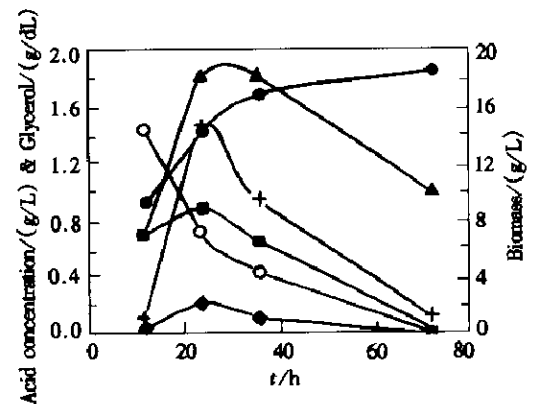


图 6 100g/L 初糖时产丙三醇假丝酵母有机酸变化曲线

Fig.6 Pattern of accumulation of organic acids in *C. glycerolgenesis* with 100.0g/L initial glucose in fermentation

—◆— 2-Ketoglutarate; —■— Pyruvate; —×— Lactate; —*— Acetate; —▲— Glycerol; —●— Biomass.

表 1 添加剂对 *C. glycerolgenesis* 有机酸产生的影响

Table 1 The effect of additives on accumulation of organic acids in *C. glycerolgenesis*/(g/L)

| Additives | Keto-glutarate | pyruvate | acetate | glycerol |
|-------------------------------------|----------------|----------|---------|----------|
| Oleic acid 10.00g/L | 0.42 | 0.09 | 1.08 | 113.0 |
| V _{B1} 1.00g/L | 0.52 | 0.95 | 2.09 | 101.2 |
| Control sample I (synthetic medium) | 0.25 | 0.26 | 2.60 | 98.0 |
| Fluoro-pyruvate3.00mg/L | 0.29 | 0.04 | 0.78 | 120.0 |
| Sulphite 50.00 g/L | 0.13 | 0.00 | 15.08 | 125.0 |
| Control sample II | 0.38 | 0.14 | 0.24 | 106.0 |

3 讨论

C. glycerolgenesis 在细胞生长和丙三醇发酵过程产生有机酸等代谢副产物,其含量变化可能是因发酵环境的改变促使细胞代谢进行自身调节的结果。产丙三醇假丝酵母在供氧不足(如装液比和玉米浆浓度较高)时导致 NADH 电子传递受阻,TCA 循环减弱,丙酮酸进一步降解减少,因为细胞代谢是一个氧化还原中性的过程,于是 NADH 的电子转而传递给代谢中间产物丙酮酸和乙醛,产生了乳酸和乙醇,并且较多丙酮酸分泌至细胞外,结果是丙酮酸、乳酸、乙醇等分泌含量较高。因此在供氧不足的情况下,产丙三醇假丝酵母与酿酒酵母有些类似,丙三醇产量不高,当加入亚硫酸盐后均能转向代谢途径,提高丙三醇的产量。反之,这些副产物在供氧充足时含量减少,乙酸和三羧酸循环的一些有机酸增加,乙酸的增加可能是同酿酒酵母类似的作用,即补充产生 NADH。而在加入亚硫酸盐发

醇时,大量产生乙酸,丙酮酸和酮戊二酸大大下降,这说明丙酮酸脱羧形成乙醛,乙醛不是还原形成乙醇,部分可能是在乙醛脱氢酶作用下形成乙酸^[7]。

参 考 文 献

- [1] Garcia E R, Sanchez G M. *Journal of Chromatography A*, 1993, 655:111 ~ 117.
- [2] Falque E L, Fernandez E G. *Journal of Chromatographic Science*, 1996, 34:254 ~ 267.
- [3] 诸葛健 方惠英.好氧发酵法生产甘油.中华人民共和国专利局 CN1110321A,1995.
- [4] 王正祥,诸葛健,方惠英.微生物学报,1999,39(1):68 ~ 74.
- [5] 金海如.无锡轻工大学学报,2000,19(3):205 ~ 208.
- [6] 管敦仪.《啤酒工业手册》中册.北京:轻工业出版社,1982.
- [7] Regine O L Z. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(8):2205 ~ 2213.

STUDY ON THE ORGANIC ACIDS METABOLISM IN *CANDIDA GLYCEROLGENESIS* UNDER DIFFERENT FERMENTATION CONDITIONS*

Jin Hairu Zhuge Jian

(Key Laboratory of Industry Biotechnology, Ministry of Education, Wuxi 214036, China)

Abstract: The organic acids in *Candida glycerolgenesis* fermentation medium affected both the glycerol yield and quality. When other fermentation condition was constant, the total acidity in medium increased when the volumetric ratio of medium to flask and corn steep liquid concentration were increased. When the volumetric ratio of medium to flask was 0.20 and the corn steep liquid concentration was 8g/L, there have high yield of pyruvate and lactate produced at growth phase, 4.1g/L and 1.0g/L, respectively, which are two times than control sample at usual fermentation condition, hence, the glycerol yield was lower. However, the volumetric ratio of medium to flask was 0.08 and the corn steep liquid concentration was 4g/L, the yield of pyruvate and lactate were lower and the glycerol yield was higher, but the acetate could be accumulated to 2.6g/L. The organic acids also could be metabolized in final fermentation process, such as the initial glucose concentration was 100g/L, after the glucose was completely utilized, both the glycerol and organic acids concentration decreased, and pyruvate or lactate could be converted to acetate in following fermentation process. In addition, the additive also can change the production of organic acids, with the addition of 1% oleic acid or V_{B1} the acetate concentration could be decreased and increased the production of pyruvate, hence, improve the yield of glycerol. While the fluoro-pyruvate or sulphite were added in medium, the acetate was increased largely and ketoglutarate was decreased accordingly, also increase the glycerol yields about 20%.

Key words: Organic acids, Glycerol, *Candida glycerolgenesis*

* This work was granted by National Nine-Five Key Task Project (96-C03-03-03)