

溶氧控制对木聚糖酶发酵过程影响的研究

冯玉枚¹,肖玲玲²,郭金玲¹,吕育财¹,余华顺³,姚 鹃³,龚大春^{1,*}

(1.三峡大学艾伦麦克德尔米德再生能源研究所,湖北宜昌 443002;

2.湖北三峡职业技术学院,湖北宜昌 443002;

3.安琪酵母股份有限公司酵母功能湖北省重点实验室,湖北宜昌 443002)

摘要:溶氧是影响木聚糖酶发酵的重要因素之一。为了优化木聚糖酶发酵过程的溶氧控制,在30 L自动发酵罐上,考察了搅拌转速和通风比不同条件下的溶氧水平对木聚糖酶发酵的影响。结果表明,发酵前期通过搅拌转速自动控制溶氧,对数期溶氧控制在15%,后期溶氧控制在45%,在此条件下,木聚糖酶活高达2406.175 U/mL,比分段控氧前酶活提升了50%。本文提出了通过溶氧与搅拌联动并配合通风比的调节实现罐内分段控氧的新思路。

关键词:分段控氧,木聚糖酶,溶氧,发酵过程

Study on the effect of dissolved oxygen control on xylanase fermentation process

FENG Yu-mei¹, XIAO Ling-ling², GUO Jin-ling¹, LV Yu-cai¹, YU Hua-shun³, YAO Juan³, GONG Da-chun^{1,*}

(1.Alan G Macdiamid Institute of Renewable Energy, China Three Gorges University, Yichang 443002, China;

2.Hubei Three Gorges Polytechnic, Yichang 443002, China;

3.Angel Yeast Co., Ltd., Yeast Function of Hubei Key Lab, Yichang 443002, China)

Abstract: Dissolved oxygen was a key operational parameter during xylanase fermentation process. In order to optimize dissolved oxygen for xylanase production, the effect of dissolved oxygen change accordingly with agitation speed and ventilation rate was investigated in a 30 L automatic fermentor. On the basis, agitation speed and ventilation rate were adjusted to control the dissolved oxygen at different fermentation stages. The results showed that the optimized strategy was found that at the earlier fermentation period, the dissolved oxygen was automatically controlled, at logarithmic phase the dissolved oxygen was controlled to 15% and in fermentation anaphase the dissolved oxygen was controlled to 45%. Under this conditions, the xylanase activity reached 2406.175 U/mL, which was 50% higher than before.

Key words: stepwise control of dissolved oxygen; xylanase; dissolved oxygen; fermentation process

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)24-0198-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.24.034

木聚糖是植物半纤维素的主要成分,是仅次于纤维素的第二丰富的可再生资源。木聚糖酶是指能够降解半纤维素木聚糖的一组酶的总称。随着资源和环境压力日益加剧,木聚糖酶在造纸、食品、饲料、保健品、生物能源等方面都具有很好的应用价值^[1-3]。木聚糖酶发酵所用菌种有里氏木霉、曲霉、链霉菌和基因工程菌毕赤酵母等^[4]。发酵方法有固态发酵和液态发酵两种。固态发酵设备简单、能耗低、易操作,但酶的单一性和稳定性比液态发酵差,液态发酵适合工业化生产。固态发酵的酶活一般在1500~30000 U/(g干曲)

不等,而液态发酵用霉菌的酶活一般都在1000 U/mL以下,用基因工程菌毕赤酵母发酵水平酶活较高,可达到2800~4000 U/mL^[5],但基因工程菌生产的稳定性和食品安全问题限制酶的应用。因此开发霉菌的高效木聚糖酶液态发酵技术具有重要意义。

霉菌的发酵属于好氧发酵,发酵液中的溶氧浓度的高低和时段控制会直接影响木聚糖酶的发酵产量。通过分段式控氧,提高木聚糖酶发酵产量的报道很少。本文以里氏木霉为菌株,在30 L德国贝朗Cplus30发酵罐上,通过将发酵过程中的搅拌转速与溶氧关

收稿日期:2015-05-04

作者简介:冯玉枚(1986-),在读硕士研究生,主要从事生物催化与生物能源方面的研究,E-mail:631034158@qq.com。

*通讯作者:龚大春(1967-),主要从事生物催化与生物化工方面的教学与研究,E-mail:185195061@qq.com。

基金项目:国家自然科学基金(21076114);宜昌市科技攻关项目(A15-101)。

联,实现分段控氧,以提高木聚糖酶的发酵水平。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

里氏木霉(*Trichoderma reesei*) 艾伦麦克德尔米德研究所提供;斜面培养基采用PDA培养基;种子培养基 采用木糖20 g/L,酵母膏20 g/L, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g/L, NaNO₃ 0.5 g/L;发酵培养基 采用乳糖45.13 g/L,玉米浆15.94 g/L, (NH₄)₂SO₄ 3 g/L, KH₂PO₄ 2.73 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.8 g/L, 无水CaCl₂ 0.6 g/L, 吐温-80 1 mL/L;培养基 pH4.0~4.5, 在121 °C下灭菌30 min。

Biostat Cplus30发酵罐 广州宝信捷生物应用设备有限公司;DYNAIR型空气压缩机 上海岱洛工贸有限公司;BPC-250F型恒温培养箱 上海一恒科技有限公司;ZQLY-180型振荡培养箱 上海赵迪生物科技有限公司;SW-CT-1D型净化工作台 苏州净化设备有限公司;UV-2000型紫外分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司;AR2140型分析天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 搅拌转速的研究 分别在200、300、400 r/min三种不同转速条件下,接种量10%,28 °C培养,通风比1.0 vvm,pH和溶氧随之自然变化,研究转速对产酶的影响。

1.2.2 通风比的研究 分别在1.0、1.5、2.0 vvm三种不同通风比条件下,接种量10%,28 °C培养,搅拌转速400 r/min,pH和溶氧随之自然变化,研究通风比对产酶的影响。

1.2.3 分段控氧实验验证 通过溶氧与搅拌联动并配合通风比的调节,将发酵前期通过搅拌转速自动控制溶氧,对数生长期时的溶氧均设置为15%,后期分别控制为15%、30%、45%。装液量为10 L,接种量10%,28 °C培养,研究其分段控制的效果。

1.2.4 测定方法

1.2.4.1 酶活定义 在50 °C,pH5.5的条件下,每分钟从10 mg/mL的木聚糖溶液中降解释放1 μmol还原糖所需要的酶量为一个酶活力单位U。

1.2.4.2 菌体生物量测定 干重法,取50 mL发酵液抽滤得到菌体,将菌体烘干至恒重,称量并减去烘干滤纸的质量即为菌体质量,再折算为每升发酵液中菌体的重量即为菌体生物量。

1.2.4.3 菌体的比生长速率和酶的比形成速率计算

a.菌体的比生长速率 μ :生物反应器中每小时单位质量的菌体所增加的菌体量,单位为h⁻¹。

b.酶的比形成速率 P_q :生物反应器中单位时间单位质量所增加的酶活量,单位为kU/(g·h)。

2 结果与分析

2.1 搅拌转速对菌体生长的影响

在木聚糖酶的发酵过程中恒定通风比,控制搅拌转速以满足细胞生长和产物合成对氧的需求。由图1、图2可知,搅拌转速300 r/min的生物量最大,200 r/min的其次,400 r/min下的生物量最小。400 r/min

下的酶活最高,其次为300 r/min,200 r/min下的酶活最低。在发酵的不同阶段,菌体代谢对氧的需求不同,搅拌转速控制溶氧容易造成溶氧不足或过剩,200 r/min的转速在菌体对数生长期时溶氧供应不足,导致溶氧跌零时间(从溶氧跌至零开始到溶氧开始回升的时间)过长,影响菌体生长从而影响酶的积累,所以酶活低。400 r/min的转速下虽然溶氧跌零时间短,但高速搅拌形成的剪切力使得菌丝断裂,不利于菌体的生长。

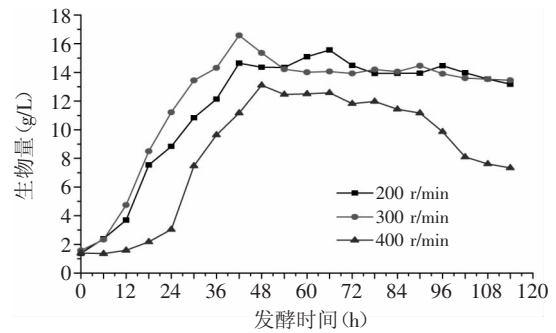


图1 不同搅拌转速下菌体生物量的变化

Fig.1 Biomass changes under different agitation speed

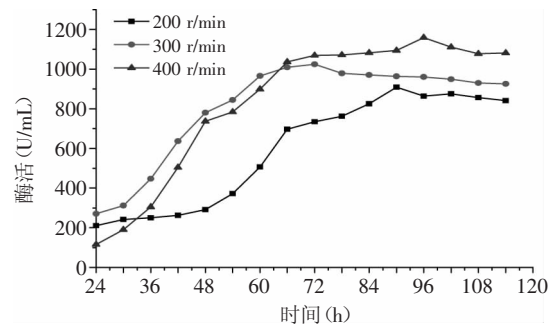


图2 不同搅拌转速下酶活的变化

Fig.2 Enzyme activity changes under different agitation speed

由图3可知,发酵0~4.5 h,转速200 r/min下的菌体生长速率快;4.5~20 h,转速300 r/min下的菌体生长快;20~36 h,转速400 r/min下的菌体生长速率快,36 h后200 r/min下的菌体生长速率快。由图4可知,发酵24~62 h,搅拌转速400 r/min下的酶积累速度最快,62 h后,200 r/min下的酶积累速度最快。木聚糖酶的发酵是好氧发酵,溶氧浓度是微生物发酵产木

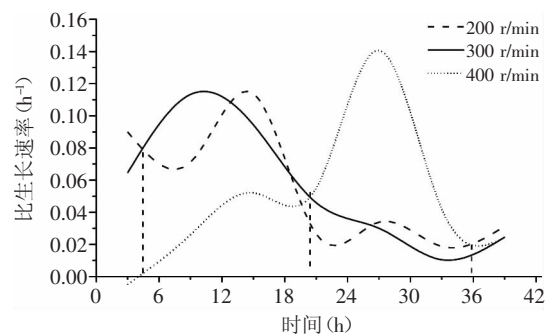


图3 不同搅拌转速下的菌体比生长速率

Fig.3 Cell specific growth rate under different agitation speed

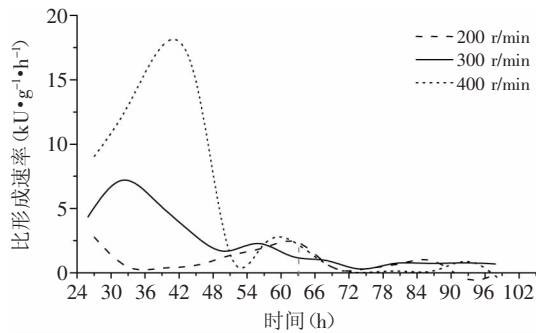


图4 不同搅拌转速下木聚糖酶的比形成速率

Fig.4 Ratio rate of enzyme formation under different agitation speed

聚糖酶的一个重要参数,溶氧过高会导致后期酶活力降低,过低会影响前期菌体的生长^[9]。因此在发酵初期,应控制较低的搅拌转速,避免搅拌产生的剪切力使得接入的种子液中的菌丝断裂。在菌体生长到一定数量后,分时段逐渐加大搅拌转速,避免低转速下溶氧不足致使菌体呼吸受到抑制,但到达菌体生长的对数期过后应逐渐降低搅拌转速,同样是为了避免菌丝受剪切力的伤害。

2.2 通风比对木聚糖酶积累的影响

搅拌转速恒定,改变通风比控制罐内溶氧。由图5可知,在38~45 h时通风比1.0 vvm的条件下生物量最大,1.5 vvm的生物量其次,2.0 vvm最小。由于1.5 vvm和2.0 vvm的通风比条件下,发酵初期产生了大量泡沫,使部分菌体随泡沫附着在罐壁上,造成生物量的损失。由图6可知,通风比2.0 vvm条件下的最大酶活最小,通风比1.0 vvm条件下的最大酶活最大但与通

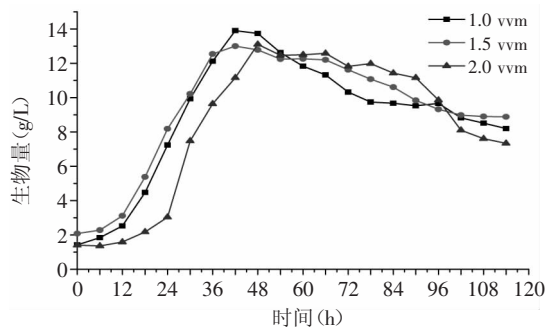


图5 不同通风比条件下菌体生物量的变化

Fig.5 Biomass changes under different ventilation ratio

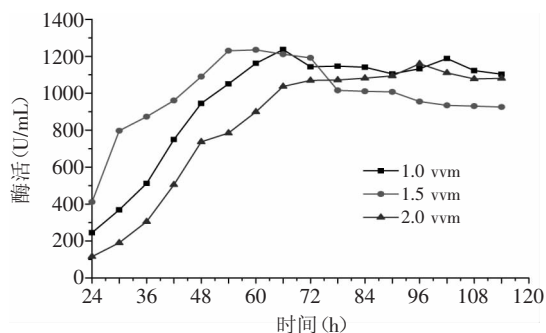


图6 不同通风比条件酶活的变化

Fig.6 Enzyme activity changes under different ventilation ratio

风比1.5 vvm相差无几。因此发酵初期的泡沫不仅影响菌体生长,造成发酵液中的生物量损失,同时还影响酶的积累^[9]。

以上研究结果表明,溶氧对木聚糖酶的生成和菌体的生长影响不一致。木聚糖酶发酵的各个阶段的目的也是不同的,发酵的前期主要是菌体的生长,中后期主要是为了获得较高的木聚糖酶,控制溶氧对最终的木聚糖酶产量影响很大。单独通过搅拌转速或通风比控制罐内溶氧对提高木聚糖酶的产量效果不明显。

2.3 分段控氧发酵研究

根据木聚糖酶发酵的特点,通过溶氧与搅拌联动并配合通风比的调节提高罐内溶氧,将发酵前期(0~42 h)通过搅拌转速自动控制溶氧,对数生长期时的溶氧均设置为15%,后期(42 h)通过与搅拌速度联动分别控制为15%、30%和45%,直至发酵结束,进行酶活和生物量的考察。图7结果显示,发酵前期各项生物指标相近,后期将搅拌与溶氧联动,控制在15%条件下,菌体在108 h时酶活可达到1435.118 U/mL,而在30%溶氧条件下,菌体到132 h酶活最大,达到2310.686 U/mL;在第三种控制方式45%溶氧条件下酶活,在120 h即可达到2381.676 U/mL。

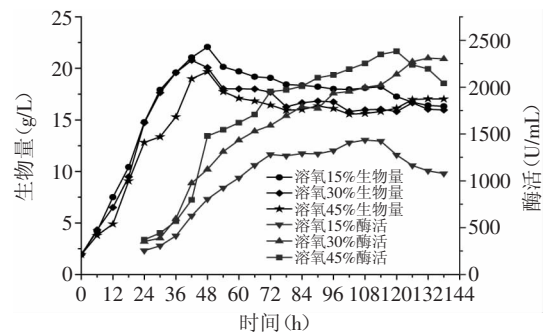


图7 后期(42 h)溶氧控制在15%、30%、45%时菌体生物量和酶活的变化

Fig.7 Fermentation parameters changes when dissolved oxygen controlled at 15%, 30%, 45% in the later period (42 h)

由以上结果可知,溶氧的分段控制不仅提高了菌体的生物量,还大大提高了木聚糖酶的酶活性,使酶活增至未控制溶氧时的1.87倍。溶氧的控制使得菌体能在对数生长期摄取到足够的氧,保证了菌体的大量生长和活性,避免了因为菌体大量生长造成溶氧跌零致使菌体的呼吸受到抑制。实际上,溶氧分段控制时,初期的低搅拌速度也避免了大量泡沫的产生,避免了大量菌体粘附于罐壁而造成菌体和产物的损失。后期溶氧控制在30%时的酶活是后期溶氧控制在15%时酶活的1.6倍;继续加大后期溶氧至45%时,酶活达到2406.175 U/mL,增加了3%。因此,在实际生产中应控制合适的溶氧水平是十分重要的。

3 结论

本文针对里氏木霉发酵产木聚糖酶在发酵罐上的涉及溶氧的相关工艺条件进行了研究。结果表明,

(下转第215页)

表4 枸杞品质衡量指标

Table 4 The physical and chemical indicators of wolfberry

指标	含量
水分	(10.56±0.73) g/100 g
灰分	(4.01±0.37) g/100 g
蛋白质	(10.69±0.54) g/100 g
脂肪	(0.89±0.78) g/100 g
总糖	(39.14±0.66) g/100 g
致病菌	未检出
黄酮	(18.23±0.50) mg/g
多糖	(0.96±0.38) mg/g
氨基酸	51.60 mg/g

量4.01 g/100 g、蛋白质含量10.69 g/100 g、脂肪含量0.89 g/100 g、总糖含量39.14 g/100 g,达到GB/T 18672-2002枸杞的特优级标准。枸杞干品中致病菌未检出,符合国家卫生标准。枸杞中黄酮检出量为(18.23±0.50) mg/g,多糖检出量为(0.96±0.38) mg/g。枸杞的氨基酸检出量达到51.60 mg/g。在被检出的14种氨基酸中,天冬氨酸含量最高,达到13.63 mg/g,其次是谷氨酸,达到10.70 mg/g。必须氨基酸赖氨酸含量1.13 mg/g、苏氨酸1.97 mg/g。

3 结论

3.1 通过单因素实验和响应面分析法,对枸杞脱蜡工艺中脱蜡时间、脱蜡温度和脱蜡溶液比3个关键工艺参数进行进一步优化研究。得到最佳脱蜡条件为脱蜡时间12 min,脱蜡温度38 ℃,脱蜡溶液比为1:2,此工艺条件下干燥时间为21.5 h,与传统脱蜡方法比较干燥时间缩短10.5 h。

3.2 对最佳脱蜡条件下的干制成品进行品质鉴定分析,鉴定结果显示枸杞干品达到国家特优级标准,符合国家卫生标准。

3.3 本研究确定的脱蜡剂及其最佳脱蜡参数不仅缩短了枸杞的干制时间,而且保留了枸杞营养成分,

提高了干制品质。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:225-226.
- [2] 郑国琦. 宁夏枸杞果实结构、发育与糖分积累关系研究[D]. 西安:西北大学,2011.
- [3] 曹振岭,高振伟,王洪力,等. 高寒地区枸杞栽培技术[J]. 特种经济动植物,2004(6):25-26.
- [4] 杜静. 枸杞表皮蜡质及制干技术的研究[D]. 兰州:兰州理工大学,2011.
- [5] 李朋亮,廖若宇,王旭,等. 不同干燥方式和除蜡剂对枸杞总黄酮的影响[J]. 食品科技,2014,39(5):79-93.
- [6] 李生晏,蔡志清,曹雪源,等. 枸杞果实的采收制干与贮藏[J]. 石河子科技,1994(3):37-38.
- [7] 康本国. 枸杞护色脱蜡剂:中国, CN200610163494.0[P]. 2007-08-01.
- [8] 王冬,朱保庆,王云鹤,等. 促干剂处理对无核白葡萄干香气的影响[J]. 食品工业科技,2013(12):106-111.
- [9] Pangavhane DR, Sawhney RL. Review of research and development work on solar dryers for grape drying[J]. Energy Conversion and Management, 2002, 43:45-61.
- [10] Ibrahim Dincer. Sun Drying of Sultana Grapes[J]. Drying Technology, 1996, 14(7):1827-1838.
- [11] Ibrahim Doymaz. Drying kinetics of black grapes treated with different solution[J]. Journal of Food Engineering, 2006, 76:212-217.
- [12] 姚思远. 混联式太阳能干燥设备优化及枸杞干燥工艺研究[D]. 保定:河北农业大学,2014.
- [13] 王丽,宋志峰,纪锋,等. 高效液相色谱法测定大豆中游离氨基酸含量[J]. 中国粮油学报,2008,23(1):180-184.
- [14] 许键,蔡慧农,倪辉,等. 壳聚糖澄清芦柑果汁工艺条件的优化[J]. 农业工程学报,2013,29(23):268-275.
- [15] 徐祥浩,李和生,葛燕燕,等. DCC缩合酯化法制备壳聚糖山梨酸酯的工艺研究[J]. 中国食品学报,2014,14(4):29-35.

(上接第200页)

搅拌转速和通风比通过影响溶氧水平从而影响产酶,单独控制搅拌转数和通风比对产酶的影响不大。通过溶氧与搅拌联动并配合通风比的调节实现分段控氧,可以有效地提高生物量及酶活。溶氧分段控制的策略为:前期溶氧使其自然下降,到对数期下降到15%时通过搅拌转速与溶氧联动将溶氧水平维持在15%,后期仍然通过搅拌速度与溶氧联动将溶氧水平维持在45%直至发酵结束,优化后最大酶活提升到2406.175 U/mL,比优化前酶活(1600 U/mL)约提高50%。

参考文献

- [1] 孙雷,朱孝霖,李环,等. 基因工程菌1020耐热木聚糖酶的纯化与性质[J]. 食品科学,2006,27(9):76-78.
- [2] Irfan M, Nadeem M, Syed Q. One-factor-at-a-time (OFAT) optimization of xylanase production from *Trichoderma viride* -

IR05 in solid-state fermentation[J]. Journal of Radiation Research and Applied Science, 2014(7):317-326.

- [3] 付冠华,李端,周晨妍,等. 木聚糖酶的研究进展及其应用[J]. 安徽农业科学,2011(35):21566-21568.
- [4] 孙振涛,赵祥颖,刘建军,等. 微生物木聚糖酶及其应用[J]. 生物技术,2007(2):93-97.
- [5] 陆彬,万红贵. 木聚糖酶发酵工艺在50 L罐中的放大[J]. 生物加工过程,2014,12(2):63-66.
- [6] 陈磊,赵祥颖,刘建军. 木聚糖酶研究进展[J]. 山东食品发酵,2014(175):7-9.
- [7] 蒋立文,廖卢燕,刘嘉. 浏阳豆豉挥发性成分的研究[J]. 中国酿造,2011(5):131-133.
- [8] 徐庆阳,冯志彬,孙玉华,等. 溶氧对L-苏氨酸发酵的影响[J]. 微生物学报,2007,34(2):312-314.
- [9] 卫功元,王大慧,陈坚. 不同溶氧控制方式下的谷胱甘肽分批发酵过程分析[J]. 化工学报,2007,9:2329-2335.