

甘露醇微生物转化的研究

袁其朋 马润宇

(北京化工大学化学工程学院 北京 100029)

摘要 研究了碳源、pH及添加西红柿汁对发酵乳杆菌生产甘露醇的影响。结果表明:以果糖为碳源,浓度为150g/L时, *Lactobacillus Ferm 101* 能够生产相当量的甘露醇而无山梨醇产生。在培养过程中通过调控pH并添加西红柿汁可使甘露醇收率达到51%。

关键词 甘露醇, 乳酸杆菌, 发酵

分类号 Q936 **文献标识码** A **文章编号** 0253-2654(1999)-04-0265-03

PRODUCTION OF MANNITOL BY MICROORGANISMS

Yuan Qipeng Ma Runyu

(College of Chemical Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029)

Abstract Effect of carbon sources, pH and potato juice on mannitol production by *Lactobacillus Ferm 101* was studied. The results showed that fructose could be transformed to mannitol without any by-product such as sorbitol, and the optimum concentration is 150g/L. The mannitol yield of 51% from fructose was obtained when CaCO_3 was used to adjust pH and tomato juice was added.

Key words Mannitol, *Lactobacillus*, Fermentation

甘露醇($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$)为医药工业的重要原料,是药品中常用的赋形剂,临床上常用的渗透性利尿药,主要用于脑水肿及青光眼,是降低颅内压的安全有效的首选药^[1]。九十年代之后,人们逐渐认识到甘露醇的一些特殊生理功能如食用后不引起血糖水平波动、不引起牙齿龋变以及

低热值等特性,甘露醇作为甜味剂和食品添加剂的用量在世界范围内迅速增加。目前美、日、英等18个国家已允许在其生产的很多产品中添加相当量的甘露醇,甘露醇的市场需求迅速

1998-07-06收稿,1998-12-02修回

增加,价格上扬^[2]。传统的生产方法如天然提取法成本过高,化学法转化率低而且副产大量价格低廉的山梨醇(占转化糖的3/4)。因而开发新的甘露醇生产工艺显得尤为迫切。

国外已有在实验室用发酵法转化果糖或葡萄糖为甘露醇的报道^[3~4],而国内这方面的研究尚属空白。用发酵法生产甘露醇的优点是甘露醇收率高,不副产山梨醇,且反应条件温和等^[5]。本文初步研究了碳源、pH及添加西红柿汁等对乳酸杆菌发酵生产甘露醇的影响。

1 材料与方法

1.1 菌种

发酵乳杆菌(*Lactobacillus Ferm 101*)购于中国科学院微生物所,经选育诱变而得。

1.2 培养基

MRS 培养基:蛋白胨 10.0g,牛肉膏 10.0g,酵母抽提物 5.0g,柠檬酸铵 2.0g,醋酸钠 5.0g, MgSO₄ 0.5g, MnSO₄ 0.25g, K₂HPO₄ 2.0g,吐温 801.0mL,定容至 1L, pH6.2。

培养条件:250mL 摇瓶装培养基 50mL,在 1 × 10⁵Pa 下灭菌 15min。接种后置 TZ-2EH 台式恒温振荡培养箱在 180r/min, 37℃ 摇瓶培养。定时取样分析。

1.3 方法

果糖和葡萄糖用 DNS 法测定^[6]。蔗糖测定时先用等体积的 1N 盐酸煮沸 5min 水解成单糖,再用 DNS 法测定。

甘露醇用 HPLC 分析。色谱柱:钙型离子交换树脂柱(Rezex, 0.78 × 30cm, USA);柱温:85℃;流动相:超纯水;流速:0.7mL/min;检测器:示差折光检测仪。

2 结果与讨论

2.1 碳源种类对甘露醇生产的影响

Boonsaeng 等^[10]的研究表明,甘露醇的碳结构骨架主要由果糖或葡萄糖通过可能的酶途径而提供,因此在研究过程中选择果糖、葡萄糖和蔗糖为碳源(50g/L)。结果如图 1 所示,以果糖为碳源,在指数生长期就有相当量的果糖被转

化成甘露醇,培养 24h 后甘露醇的收率达 26%;而蔗糖则在菌体生长达到停滞期后有少量转化成甘露醇;而以葡萄糖为碳源,在整个过程中始终未有甘露醇的产生。值得强调的是,以 3 种糖为碳源进行培养过程中均未检测到副产物山梨醇的存在。

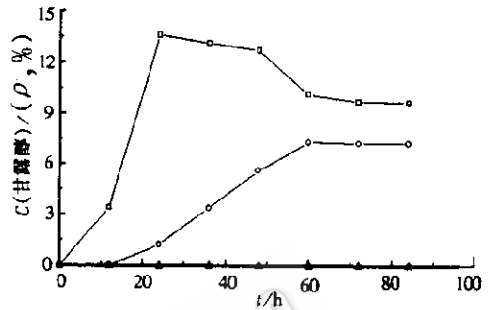


图1 碳源对乳杆菌生产甘露醇的影响

□. 果糖, ○. 蔗糖, △. 葡萄糖

2.2 初始果糖浓度对甘露醇生产的影响

为了考察不同果糖浓度对甘露醇生产的影响,分别选择培养基初始果糖浓度为 50, 100, 150, 200 和 300g/L 进行发酵乳杆菌的培养,结果如图 2 所示。在初始糖浓度为 50、100 和 150g/L 时,经过 60h 的培养,发酵液中甘露醇的浓度分别达到 13、26 和 39g/L,收率均约为 26%,即甘露醇收率基本恒定。而随着初始糖浓度进一步增加,培养液中甘露醇的含量没有明显的增加。当初始糖浓度为 300g/L 时,甘露醇的含量则非常少,表现出高底物浓度下的阻遏作用,因而果糖浓度以 150g/L 为佳。

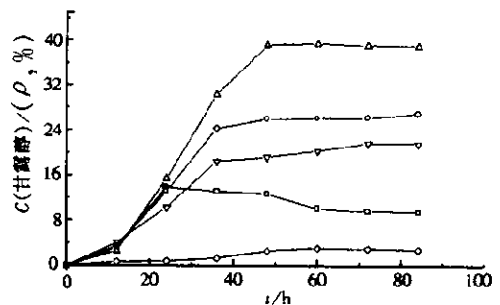
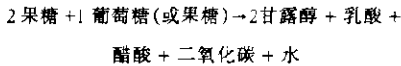


图2 不同果糖浓度对乳杆菌生产甘露醇的影响

□. 50g/L, ○. 100g/L, △. 150g/L, ▽. 200g/L, ◇. 300g/L

2.3 调控 pH 对甘露醇生产的影响

在发酵法生产甘露醇过程中,果糖被还原形成甘露醇,一般认为,其代谢过程如下^[3]:



因此,在发酵过程中,除有甘露醇生成外,尚有一定的乳酸和醋酸生成,从而引起培养液 pH 值的下降。如表 1 所示,当培养至第 60h 后, pH 值已约为 3.5 左右。这种过酸的环境抑制了乳酸菌的生长和代谢,虽然培养基中仍有相当量的果糖,但已基本不发生转化。为此在乳酸菌接种培养 24h 后,向摇瓶中加入 CaCO_3 (5%) 以控制过程中的 pH 值,结果如表 1 所示。

表1 调控与不调控 pH 对甘露醇生产的影响

培养时间 (h)	调控 pH			不调控 pH		
	pH	果糖浓度 (g/L)	甘露醇浓度 (g/L)	pH	果糖浓度 (g/L)	甘露醇浓度 (g/L)
0	6.20	150.0	0.0	6.20	150	0
12	5.90	137.0	2.8	5.88	137.2	2.8
24	5.10	112.7	15.6	5.1	110.1	15.5
36	6.03	69.2	42.1	4.4	90.2	30.3
48	5.96	41.3	57.3	3.9	74.3	39.2
60	6.02	34.2	62.7	3.7	70.2	39.1
72	6.01	31.3	63.1	3.5	70.0	39.1

从表 1 可以看出,加入 CaCO_3 后,培养液中的 pH 值基本可维持在 6.0 左右。果糖的转化率大大提高,甘露醇收率达到 42% (约 63g/L),比未调 pH 值增加了 16%。

2.4 添加西红柿汁对甘露醇生产的影响

乳酸杆菌的生长对维生素有一定的需求,为此在接种培养 48h 后向培养基中流加 10ml 自制西红柿汁。测定培养液中甘露醇的含量,发现甘露醇的含量随培养时间有相当量的增加,在培养 72h 后,甘露醇的浓度达 76.5g/L,转化率为 51%,比未添加时增加了约 9%。

3 结语

考察了果糖、葡萄糖和蔗糖 3 种碳源对发酵乳酸杆菌生产甘露醇的影响。结果表明,该菌株能够将相当量的果糖转化为甘露醇,浓度以 150g/L 为佳。在培养过程中通过调控 pH 并添加西红柿汁可提高甘露醇收率,最终达到 51%。

虽然本研究中甘露醇的收率远大于化学法 (25%),展现了发酵法生产甘露醇的美好前景,但与国外研究相比仍有一定的差距。如 Yun^[4] 等利用 *Lactobacillus* sp. KY 107 发酵从果糖 (初始浓度 100g/L) 生产甘露醇,经过 75h 的培养,收率达到 71%。因此,要实现甘露醇微生物转化的工业化生产,尚有许多工作要做:如进行菌种的筛选、诱变以得到耐高底物浓度、发酵周期短且收率高的新型微生物;构建基因工程菌株^[5];优化培养条件,寻找培养基代用品以降低培养基成本等。

参 考 文 献

- [1] 严拯宇,姜新民,汪海. 中国药科大学学报, 1996, 27(4): 242~244.
- [2] Le Bot Y, Gouy P A. Polyols from starch. In Kearsley *et al.* eds Handb. Starch Hydrolysis Prod. Deriv. 1995, 155~777.
- [3] Yoshikuni I, Akira T, Hiroshi A *et al.* European Patent Application No. 486024.
- [4] Yun J W, Kang S C, Song S K. Biotechnol. Lett., 1996, 18(1): 35~40.
- [5] Soetaert W, Buchholz K, vandamme E J. Comptes Rendus de l'Academie d'Agriculture de France. 1994, 80(4): 119~127.
- [6] Stankovic L, Bilik V, Matulova M. Folia Microbiol., 1989, 34: 511~514.
- [7] Yun J W, Kang S C, Song S K. Biotechnol. Lett., 1994, 16(9): 949~954.
- [8] Elkady I A, Moubasher M H, Mostafa M E. Folia Microbiol., 1995, 40(5): 481~486.
- [9] 贾淑颖,穆国平,任树林. 食品与发酵工业, 1989, 21(2): 30~34.
- [10] Boonsaeng V, Sullivan P A, Shepherd M G. Can. J. Microbiol., 1976, 22: 808~816.