

促进因子对阿舒假囊酵母 合成核黄素的影响

刘志文¹, 黄林¹, 孔令宝¹, 程新¹, 涂晓嵘¹, 李昆太^{1,2*}

(1. 江西农业大学 生物科学与工程学院, 江西 南昌 330045; 2. 南昌市发酵应用技术重点实验室, 江西 南昌 330045)

摘要: 研究在发酵培养基中添加不同促进因子(玉米浆、酵母膏和豆油)对阿舒假囊酵母合成核黄素的影响。试验结果表明:添加 10 g/L 玉米浆是最促进阿舒假囊酵母菌体生长和核黄素合成的最适质量浓度; 40 g/L 酵母膏分别在 0 h 补加 20 g/L, 24 h 和 48 h 各补加 10 g/L, 其核黄素产量达到 1 587.37 mg/L, 比在 0 h 1 次添加 40 g/L 酵母膏的产量提高了 21.07%; 在发酵培养基中添加 2~5 g/L 豆油, 对核黄素的合成均有促进作用。

关键词: 阿舒假囊酵母; 核黄素; 生物合成; 促进因子

中图分类号: Q815; TQ925 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000 - 2286(2010)02 - 0363 - 05

Effects of Stimulators on Riboflavin Biosynthesis by *Eremothecium ashbyii*

LIU Zhi-wei¹, HUANG Lin¹, KONG Ling-bao¹,
CHENG Xin¹, TU Xiao-rong¹, LI Kun-tai^{1,2*}

(1. College of Biological Science and Technology, JAU, Nanchang 330045, China; 2. Nanchang Key Laboratory of Applied Fermentation Technology, Nanchang 330045, China)

Abstract: In order to improve the productivity of riboflavin by *Eremothecium ashbyii* in shake-flask cultivation, the effects of various stimulators (corn steep liquor, yeast extract and bean oil) on riboflavin biosynthesis were investigated. The results showed that 10 g/L of corn steep liquor was optimal for cell growth and riboflavin production. When a total of 40 g/L of yeast extract was added to the fermentation broth at 0 h (20 g/L), 24 h (10 g/L) and 48 h (10 g/L), respectively, a maximum riboflavin production (1 587.37 mg/L) was obtained, which was 21.07% higher than that obtained under 40 g/L of yeast extract added at 0 h. When the concentration of bean oil in fermentation medium was 2 - 5 g/L, there was a significant stimulation on riboflavin biosynthesis.

Key words: *Eremothecium ashbyii*; riboflavin; biosynthesis; stimulators

核黄素(riboflavin)又名维生素 B₂, 化学名称为 6,7-二甲基-9-(1'-D-riboityl)-异咯嗪, 其分子式为 C₁₇H₂₀N₄O₆, 相对分子质量为 376^[1-2]。目前, 核黄素主要用于防治核黄素缺乏症, 如舌炎、口角炎等^[3]。近几年来研究表明, 核黄素还具有利尿、降血脂和改善心脏功能等作用。

由于化学合成法较为复杂且成本高, 因此, 核黄素主要采用微生物发酵法进行生产^[4]。目前广泛应用于工业化发酵产核黄素的菌株主要有阿舒假囊酵母(*Eremothecium ashbyii*)、棉阿舒囊霉(*Ashbya gossypii*)。

收稿日期: 2009 - 12 - 18 修回日期: 2010 - 03 - 16

基金项目: 江西农业大学博士科研启动基金资助项目(08 - 2064)

作者简介: 刘志文(1967 -), 女, 助理实验师, 主要从事微生物学研究; *通讯作者: 李昆太, 博士, E-mail: atai78@sina.com.

针对阿舒假囊酵母产核黄素的发酵工艺已有一些报道。例如,李嵘等^[5]以阿舒假囊酵母为菌株,研究出了摇瓶发酵核黄素过程中碳源、氮源、微量元素、初始 pH、接种量和促生因子等发酵条件的优化配方。为了进一步提高核黄素的产量,惠明等^[6]提出,适当减少 EMP 途径的碳架物质流而增加 HMP 途径的碳架物质与能量的代谢流,将有利于核黄素的过量合成。陆文清等^[7]对核黄素的补料发酵进行了研究。

氮源是发酵培养基中最重要的组分之一,它用于菌体的生长以及代谢产物的形成。有机氮源含有丰富的蛋白质和多肽,在微生物分泌的蛋白酶作用下水解成氨基酸,被菌体代谢利用^[8]。氮源的调节作用在微生物的代谢过程中是非常显著的,它会对初级代谢及次级代谢途径中相关酶的合成产生一定的影响^[9]。由于阿舒假囊酵母产核黄素的发酵过程属于次级代谢过程,因此有必要对关键营养因子—氮源进行研究。又有文献报道,豆油可作为一种促生因子,刺激阿舒假囊酵母合成核黄素^[5]。

基于此,本文考察了发酵培养基中关键促进因子(玉米浆、酵母膏和豆油)对阿舒假囊酵母合成核黄素的影响,并对酵母膏的补加模式进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 阿舒假囊酵母 (*Eranothecium ashbyii*),由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 核黄素标准品(上海史瑞可生物科技有限公司);糖蜜(河北华荣制药有限公司惠赠);玉米浆(江西省国药有限公司惠赠);蛋白胨(江西省国药有限公司惠赠);酵母膏(北京奥博星生物技术有限公司);其它试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基 (1)斜面培养基(g/L):葡萄糖 10,蛋白胨 10, KH_2PO_4 2.0, MgSO_4 1.5,琼脂 20, pH 5.6~6.0。(2)种子培养基(g/L):葡萄糖 30,蛋白胨 15,玉米浆 5, KH_2PO_4 1.0, MgSO_4 0.75, pH 5.6~6.0。(3)发酵培养基(g/L):糖蜜(48 g 总糖/100 g) 104.20, KH_2PO_4 2.0, MgSO_4 1.0, NaCl 1.0, pH 6.5~7.0。(4)主要仪器:摇床、可见分光光度计、电子天平等。

1.2 方法

1.2.1 摇瓶培养方法 (1)斜面培养:从 -20℃ 的冰箱中取出保藏好的甘油管菌种,接种于配制好的斜面,置于 28℃ 恒温培养箱培养 48 h。(2)种子培养:以无菌水洗下斜面上的菌体,制成菌悬液。取菌悬液 2 mL 接至装量为 30 mL 三角瓶 250 mL 的种子培养基中,28℃ 在摇床上振荡(180 r/min)培养 36 h。(3)摇瓶分批发酵:按 10%接种量将培养好的种子液接至装量为 30 mL 三角瓶 250 mL 的发酵培养基中,28℃ 振荡(180 r/min)培养 120 h。定时取样测定相关参数,测定结果为 3 个平行样的平均值。

1.2.2 玉米浆添加量对核黄素合成的影响试验 在发酵培养基分别添加 0, 5, 10, 15, 20 g/L 质量浓度的玉米浆。

1.2.3 酵母膏对阿舒假囊酵母发酵的影响试验 (1)酵母膏添加浓度对菌体生长和核黄素合成的影响试验。分别在发酵培养基加入 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 g/L 质量浓度的酵母膏,发酵 120 h 时,分别考察酵母膏对阿舒假囊酵母菌体生长和产物合成的影响。(2)2 种酵母膏浓度分别在不同时补加模式对菌体生长和核黄素产量的影响试验(表 3)。

1.2.4 豆油对核黄素合成的影响试验 分别在发酵培养基加入 0, 1, 2, 3, 4, 5 g/L 质量浓度的豆油,发酵 120 h 后分别考察不同浓度豆油对阿舒假囊酵母发酵产核黄素的影响。

1.2.5 分析方法 (1)菌体生物量测定。采用测量菌丝干重法(Dry cell weight, DCW)。取 10 mL 发酵液至离心管中,5 000 r/min 离心,去上清液,用蒸馏水洗菌体 1 次,所得菌体 80℃ 烘至恒重后称量。(2)总糖测定:采用 DNS 法^[10]。(3)核黄素含量的测定:比色法^[11]。

2 结果与讨论

2.1 玉米浆添加量对核黄素合成的影响

玉米浆含有丰富的氨基酸、多肽、有机物、还原糖、磷、微量元素和生长素,广泛作为工业微生物发酵中常用的有机氮源。不同浓度的玉米浆对阿舒假囊酵母菌体生长和核黄素合成的影响结果见表 1。

表 1 不同浓度玉米浆对菌体生长及核黄素合成的影响

Tab 1 Effects of various concentrations corn steep liquor on cell growth and riboflavin biosynthesis in shake - flask culture by *E. ashbyii*

玉米浆质量浓度 / ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) C_{CSL}	菌体干重 / ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) DCW	核黄素产量 / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) Riboflavin	糖耗量 / ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) $S_{\text{total sugar}}$	菌体得率系数 / ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) $Y_{x/s}$	产物得率系数 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) $Y_{p/s}$
0	7.54	683.26	50	0.1508	13.6652
5	8.42	825.81	50	0.1684	16.5162
10	9.25	907.95	50	0.1850	18.1590
15	9.47	811.56	50	0.1894	16.2312
20	9.20	727.03	50	0.1840	14.5406

由表 1 可以看出,当发酵培养基中添加玉米浆时,最终 (120 h) 的菌体量以及核黄素产量均得到了明显增加。其中,当发酵培养基中玉米浆质量浓度为 10 g/L 时,菌体生长量、核黄素产量、基于总糖消耗的菌体得率系数和基于总糖消耗的产物得率系数分别为 9.25 g/L、907.95 mg/L、0.1850 g/g 和 18.1590 mg/g, 这表明添加 10 g/L 玉米浆是最促进阿舒假囊酵母的菌体生长和核黄素的合成的最适质量浓度。

氮源的起始浓度不但会影响菌体生长,而且对产物的合成有显著的影响^[12-14]。由本试验结果可以分析,玉米浆能显著促进阿舒假囊酵母的菌体生长,但是太高浓度的氨基氮可能会对核黄素合成途径中的酶产生阻遏效应,反而抑制了核黄素的合成。

2.2 酵母膏对阿舒假囊酵母发酵的影响

2.2.1 酵母膏添加浓度对菌体生长和核黄素合成的影响 分别在发酵培养基加入 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 g/L 质量浓度的酵母膏,最终 (120 h) 的发酵结果如表 2 所示。

表 2 不同浓度酵母膏对菌体生长及核黄素合成的影响

Tab 2 Effects of various concentrations yeast extract on cell growth and riboflavin biosynthesis in shake - flask culture by *E. ashbyii*

酵母膏质量浓度 / ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) C_{YE}	菌体干重 / ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) DCW	核黄素产量 / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) Riboflavin	糖耗量 / ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) $S_{\text{total sugar}}$	菌体得率系数 / ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) $Y_{x/s}$	产物得率系数 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) $Y_{p/s}$
0	7.54	683.26	50	0.1508	13.6652
5	8.01	852.78	50	0.1602	17.0556
10	8.43	989.54	50	0.1686	19.7908
15	8.82	1207.57	50	0.1764	24.1514
20	9.14	1295.35	50	0.1828	25.9070
25	9.58	1321.46	50	0.1916	26.4292
30	9.66	1302.89	50	0.1932	26.0578

由表 2 可以看出,当发酵培养基中的酵母膏含量由 0 g/L 逐渐增加到 30 g/L 时,最终所得的菌体量也不断增加。其中,当发酵培养基中酵母膏用量为 25 g/L 时,菌体量、黄素产量、基于总糖消耗的菌体得率系数和基于总糖消耗的产物得率系数分别为 9.58 g/L、1321.46 mg/L、0.1916 g/g 和 26.4292 mg/g, 这表明添加 25 g/L 酵母膏是最促进阿舒假囊酵母菌体生长和核黄素合成的最适质量浓度。

2.2.2 酵母膏添加时机对核黄素合成的影响 由于阿舒假囊酵母中合成核黄素属于次级代谢过程^[5],加之上面的试验结果(表 2)表明酵母膏对核黄素的合成具有显著的促进作用,考虑到发酵液中氨基氮水平会核黄素途径中相关酶的合成产生一定的影响,因此有必要对酵母膏的补加模式(补加时间和补加浓度)进行考察。具体的补加模式及其结果如表 3 所示。

表 3 酵母膏补加模式对菌体生长和核黄素产量的影响

Tab 3 Effects of concentrations and models of yeast extract feeding on cell growth and riboflavin production in shake - flask cultivation by *E. ashbyii*

试验 序号 Run	酵母膏补加模式 Models of yeast extract feeding		菌体干重 / (g · L ⁻¹) DCW		核黄素产量 / (mg · L ⁻¹) Riboflavin	
	补加质量浓度 / (g · L ⁻¹) Concentration	补加时间 / h Feeding models	实际值 Value	百分比 / % Percent	实际值 Value	百分比 / % Percent
1	30	0	9.75	100	1 311.07	100
2	20/10	0/24	9.71	99.59	1 389.75	106.00
3	20/10	0/48	9.64	98.87	1 463.26	111.61
4	20/10	0/72	9.45	96.92	1 326.68	101.19
5	10/10/10	0/24/48	9.40	96.41	1 474.32	112.45
6	40	0/40	9.96	102.15	1 197.84	91.36
7	20/20	(0/24	9.89	101.44	1 416.93	108.07
8	20/20	0/48	9.88	101.33	1 505.45	114.83
9	20/10/10	0/24/48	9.82	100.72	1 587.37	121.07

从表 3 可以看出, 30 g/L 酵母膏分别在 0, 24, 48 h 各补加 10 g/L, 其核黄素产量达到 1 474.32 mg/L, 比在 0 h 一次添加 30 g/L 酵母膏的产量提高了 12.45%。40 g/L 酵母膏分别在 0 h 补加 20 g/L、24 h 和 48 h 各补加 10 g/L, 其核黄素产量达到 1 587.37 mg/L, 比在 0 h 一次添加 40 g/L 酵母膏的产量提高了 21.07%。

酵母膏相比玉米浆而言, 对核黄素的合成显示出更为显著的正效应。但是在酵母膏相同添加总量的情况下, 多次补加以控制发酵液中的氨基氮浓度维持在适量水平, 虽然对菌体生长有一定的影响, 但是可以克服发酵液中过高氨基氮水平对核黄素合成的负作用。

2.3 豆油对核黄素合成的影响

不同浓度的豆油对核黄素合成产量的影响试验结果见表 4。

表 4 不同浓度豆油对核黄素合成的影响

Tab 4 Effects of various concentrations of bean oil on riboflavin biosynthesis by *E. ashbyii*

豆油添加质量浓度 / (g · L ⁻¹) C _{BO}	0	1	2	3	4	5
核黄素产量 / (mg · L ⁻¹) Riboflavin	675.41	782.16	837.68	851.72	849.09	847.25
百分比 / % Percent	100	115.80	124.03	126.10	125.71	125.44

由表 4 可以看出, 发酵培养基中添加豆油, 对核黄素的合成均有促进作用。当豆油的添加量为 2 ~ 5 g/L 时, 核黄素的产量差异较小, 相对于 CK 可以提高 24% ~ 26%。

在发酵过程中, 添加豆油的目的有两种, 一是作为消沫剂使用, 二是作为碳源使用。一些需氧细菌、放线菌能通过 β -氧化途径利用脂肪酸作为能源和前体, 特别是对于大环内酯类抗生素, 油的分解代谢产物有可能作为产物合成的前体^[15]。有文献报道, 豆油能显著促进核黄素的合成^[5], 这与本试验所得结果一致, 但是究竟是豆油的哪种作用机制促进了核黄素的合成目前还没有报道。

3 结 论

在摇瓶发酵培养条件下, 分别探索不同质量浓度的玉米浆、不同质量浓度的酵母膏和不补加方式及

不同质量浓度的豆油对核黄素生物合成的影响。结果表明,添加 10 g/L 玉米浆是最促进阿舒假囊酵母的菌体生长和核黄素的合成的最适质量浓度;40 g/L 酵母膏分别在 0 h 补加 20 g/L、24, 48 h 各补加 10 g/L,其核黄素产量达到 1 587.37 mg/L,比在 0 h 一次添加 40 g/L 酵母膏的产量提高了 21.07%;在发酵培养基中添加 (2~5) g/L 豆油,对核黄素的合成均有促进作用。

参考文献:

- [1] 张会图,姚斌,范云六.核黄素基因工程研究进展[J].中国生物工程杂志,2004,24(12):32-38
- [2] Boris I, Wolfgang E, Nicholas S, et al Biosynthesis of Vitamin B₂ [J]. J Biol Chem, 2005, 31(280): 28541 - 28546
- [3] 顾昭保,戴传云,朱鑫庆.核黄素生理生化特性及其功能[J].食品研究与开发,2004,25(12):90-95
- [4] 仪宏,朱文正,张华峰.核黄素生产技术发展[J].中国食品添加剂,2003(4):14-17
- [5] 李嵘,余俊红,吴佩琮,等.发酵法制核黄素[J].无锡轻工大学学报,1997,16(1):14-18
- [6] 惠明,孙俊良,张星元. *Ecanothecium ashbyii* T30 过量合成核黄素发酵工艺条件研究[J].饲料研究,2000(3):13-16
- [7] 陆文清,章克昌,吴佩琮.核黄素产生菌的补料发酵[J].无锡轻工大学学报,2000,19(3):240-243
- [8] 俞俊棠,唐孝宣,邬行彦,等.新编生物工艺学[M].北京:化学工业出版社,2003
- [9] Merrick M J, Edwards R A. Nitrogen control in bacteria[J]. Microbiol Rev, 1995, 59: 604 - 622
- [10] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(3): 426 - 428
- [11] 黄伟坤.食品检验与分析[M].北京:轻工业出版社,1989
- [12] Madden T, Ward J M, Ison A P. Organic acid excretion by *Streptomyces lividans* TK24 during growth on defined carbon and nitrogen sources[J]. Microbiology, 1996, 142: 3181 - 3185
- [13] Cho Y J, Park J P, Hwang H J, et al Production of red pigment by submerged culture of *Paecilomyces sinclairii*[J]. Lett Appl Microbiol, 2002, 35: 195 - 202
- [14] Chang Y N, Huang J C, Lee C C, et al Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lovastatin by *Monascus ruber*[J]. Enzyme Microb Technol, 2002, 30: 889 - 894
- [15] 张嗣良,储炬.多尺度微生物过程优化[M].北京:化学工业出版社,2003:101.