

发酵法提纯大豆糖蜜中低聚糖的菌株筛选

赵华¹, 段盛林², 何聪芬¹, 王领¹, 宋杰¹, 王雪², 陈志蓉³

1. 北京工商大学;北京市植物资源研究开发重点实验室,北京 100048
2. 中国食品发酵工业研究院,北京 100027
3. 中国食品药品检定研究院,北京 100050

摘要 大豆糖蜜是大豆浓缩蛋白生产的副产物,是脱脂豆粕乙醇萃取液经浓缩后形成的一种棕色黏稠的浆状物,含有多种功能性成分,主要有大豆低聚糖、大豆异黄酮等生理活性物质,对人体健康有着许多有益的作用。本文运用发酵法消化大豆糖蜜中的单糖和多糖,提高功能性多糖浓度,达到糖原纯化的目的,对1种乳酸菌、4种酵母菌进行筛选试验,筛选出消耗蔗糖最多,同时水苏糖、棉子糖等低聚糖保留率最高的1种酵母菌,即酿酒酵母C。其最佳发酵条件为:糖蜜初始糖浓度9%,初始pH值6.5,接种酿酒酵母C的接种量3%,在30℃的条件下发酵24h。大豆糖蜜发酵液中各糖分的保留率为:蔗糖0%,功能性低聚糖60.90%,果糖和葡萄糖含量24.46%,发酵的重复稳定性高达95%以上。

关键词 功能性低聚糖;大豆糖蜜;发酵

中图分类号 TS2

文献标识码 A

doi 10.3981/j.issn.100-7857.2011.19.002

Purification of Oligosaccharides Through Fermentation Technology with Screening of Strains

ZHAO Hua¹, DUAN Shenglin², HE Congfen¹, WANG Ling¹, SONG Jie¹, WANG Xue², CHEN Zhirong³

1. Beijing Key Laboratory of Plant Resources Research and Development; Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China
2. China National Research Institute of Food & Fermentation Industries, Beijing 100027, China
3. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

Abstract Soybean molasses is the by-product of the production of concentrated proteins in soybeans. It is a kind of brown sticky pulp thing after the concentration of extract liquor by the ethanol of defatted soybean meal. Soybean molasses contains a variety of functional components. It mainly includes soybean oligosaccharides, soybean isoflavone, and other physiologically active components, which have many beneficial effects on the human health. By using monosaccharides and polysaccharides with the method of fermentation, the concentration of functional polysaccharides is improved and the purpose of purifying glycogen is achieved. One strain of yeast, that is, *Saccharomyces cerevisiae* C that has the function of high consumption to sucrose, and high retention rate to stachyose and raffinose is screened from four stains of yeast and one strain of lactobacillus. The optimal condition for the fermentation of soybean molasses is initial molasses sugar concentration of 9%, initial pH value of 6.5, inoculation amount of 3% and fermentation at 30℃ for 24h. The retention rates in hydrolysates of soybean molasses are 0% for sucrose, 60.90% for functional oligosaccharide, and 24.46% for glucose and fructose. And repeat stability reaches at 95% under the optimal fermentation condition.

Keywords functional oligosaccharide; soybean molasses; fermentation

0 引言

大豆糖蜜是醇洗大豆浓缩蛋白生产的副产物,是脱脂豆粕乙醇萃取液经浓缩后形成的一种棕色黏稠的浆状物^[1]。近

年来有研究发现,大豆糖蜜中含有多种功能性成分,主要有大豆低聚糖、大豆磷脂、大豆皂苷和大豆异黄酮等生理活性物质,对人体健康有着许多有益的作用^[2]。大豆低聚糖是大豆

收稿日期:2010-10-13;修回日期:2011-05-11

作者简介:赵华,副教授,研究方向为天然产物分离及应用,电子信箱:zhaoh@btbu.edu.cn;陈志蓉(通信作者),助理研究员,研究方向为化妆品卫生化学,电子信箱:chenzr@sfd.gov.cn

糖蜜中最重要物质之一,它被人体肠道内有益细菌利用并促进它们增殖,从而降低肠道中的 pH 值,增强机体免疫力,对预防疾病和抗衰老有明显效果^[3-5]。它在大豆中的含量不高,在糖蜜中却被浓缩了。因此大豆糖蜜具有很好的开发应用前景。目前大豆低聚糖作为一种新型的功能性食品基料,已应用于饮料、冰淇淋、面包等食品的生产中^[6]。

大豆糖蜜主要含有单糖(葡萄糖、果糖)、双糖(蔗糖、麦芽糖、乳糖)、三糖(棉子糖)和四糖(水苏糖)及少量蛋白。棉子糖和水苏糖是优质的功能性低聚糖,被誉为“天然超强双歧因子”,是大豆低聚糖的主要功能成分,但与单糖和双糖难以分离,本文采用发酵的方法消化单糖和双糖,从而提高功能性多糖的浓度,是一种糖原纯化的新方法。碳源物质可以被微生物利用,是构成细胞代谢产物的营养物质。碳源物质通过细胞内的一系列化学变化,被微生物用于合成各种代谢产物。微生物对碳化合物的需求是极为广泛的,根据碳素的来源不同,可将碳源物质分为无机碳源物质和有机碳源物质。不同的微生物对不同碳源的分解和利用情况是不一样的。糖类是较好的碳源,尤其是单糖(葡萄糖、果糖)和双糖(蔗糖、麦芽糖、乳糖),绝大多数微生物都能利用^[9]。本文提出一种新的精制大豆低聚糖制备方法,即考虑微生物对底物利用的选择性^[7],选择合适的菌种,去除糖蜜中的蔗糖,筛选出优先利用双糖、最大限度保留低聚糖的菌种。采用微生物发酵法制备精制大豆低聚糖,既可以提高大豆低聚糖的功能性,又能大幅度降低了生产成本,对大豆糖蜜进行了充分的利用。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 菌株

乳酸菌包括保加利亚乳杆菌(*Lb. bulgaricus*)、嗜热链球菌(*Str. thermophilus*)(活菌数>10⁹g),购自北京川秀科技有限公司。

酿酒酵母 B 购自安琪酵母股份有限公司;鲁氏酵母 1532、酿酒酵母 A、酿酒酵母 C 均购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。

1.1.2 培养基

乳酸菌发酵培养基:10g/L 的酪蛋白胨;2g/L 的 K₂HPO₄;0.2g/L 的 MgSO₄·7H₂O;2g/L 的柠檬酸二胺;5g/L 的乙酸钠;9%糖蜜溶液 1L。

酵母菌扩培培养基:5Brix 麦芽汁培养基;琼脂 2%—2.5%。

酵母菌种子培养基:10g/L 的葡萄糖;8.5g/L 的酵母膏;1.3g/L 的 NH₄Cl;0.1g/L 的 MgSO₄·7H₂O;0.06g/L 的 CaCl₂。

酵母菌发酵培养基:9%糖蜜溶液 1L。

以上培养基均为自然 pH 值(6—8),经 121℃灭菌 15min 备用。

1.1.3 材料与试剂

大豆糖蜜溶液(黏稠液体)由北京富海科生物技术有限公司提供。

K₂HPO₄、MgSO₄·7H₂O、NH₄Cl、CaCl₂、柠檬酸二胺、乙酸钠、均为市售分析纯;酵母浸膏、酪蛋白胨、琼脂为生化试剂;麦芽汁培养基为自制。

1.1.4 仪器与设备

Hypersil-NH₂ 柱(大连依利特公司);示差检测器(日本岛津公司);高压灭菌锅(上海申安医疗器械厂);恒温培养箱(上海一恒仪器厂);移液枪(德国 Brand);PHS-30 型 pH 计(上海精科雷磁)。

1.2 方法

1.2.1 微生物活化培养

根据微生物生长特性,对 1 种乳酸菌、4 种酵母菌进行菌株活化处理,并确定最佳发酵培养条件。

1.2.2 糖的定量分析

在相关企业标准及大量摸索性试验的基础上,本文的糖液检测条件确定为:Hypersil-NH₂ 柱(250mm×4.6mm,5μm);示差检测器;流动相为乙腈:水=70:30(V/V);流速(1mL/min);柱温(30℃);进样量为 10μL^[8]。

在测定的前一天接通示差折光检测器电源,预热稳定,安上色谱柱,调柱温至 30℃,以 0.1mL/min 的流动相平衡过夜。正式进行分析前,将所用流动相输入参比池 30min 以上,再恢复正常流路使流动相经过样品池,调节流速至 1.0mL/min,走基线,待基线走稳后即可进样,进样量为 10μL。各种糖含量(占总糖)的计算方法为面积归一化法。

1.2.3 发酵糖液及发酵后处理

糖蜜溶液稀释至折光为 9Brix。发酵后糖液的处理:发酵液以 3500r/min 的转速离心 5min,取上清液 3mL 加入 7mL 无水乙醇,混合均匀,离心取上清液加 2%的活性炭对糖液进行脱色,边加热边搅拌 30min,热过滤,滤液稀释至折光为 2.0Brix 后,经 0.22μm 的微孔滤膜过滤得到待分析糖液,然后用 HPLC 法对糖液进行检测,低聚糖的纯度计算方法为面积归一化法^[9]。

1.3 微生物培养条件

乳酸菌发酵培养条件:2g 乳酸菌干粉加入到 1L 培养基中,培养温度设为 37℃,置于恒温培养箱中。

酵母菌发酵培养条件:(1) 酿酒酵母斜面菌种进行 3 次传代培养后,用无菌水将斜面菌体冲洗后,调节菌体浓度为 10⁸/mL,取其 25mL 加入 1L 培养基中,培养温度设为 30℃,置于恒温培养箱中;(2) 鲁氏酵母斜面菌种进行 3 次传代培养后,用无菌水将斜面菌体冲洗后,调节菌体浓度为 10⁸/mL,取其 25mL 加入 1L 培养基中,培养温度设为 30℃,置于恒温培养箱中;(3) 2.5g 酿酒酵母干粉加入 25mL 2%(质量浓度)的蔗糖溶液恒温至 37℃活化 30min,加入 1L 培养基中,培养温度设为 28℃,置于恒温培养箱中。

酿酒酵母与鲁氏酵母混合发酵培养条件:每升培养基中添加菌体浓度为 10⁸/mL 的酿酒酵母菌悬液 25mL,放入 30℃恒温培养箱中 24h,加热培养基终止发酵,再添加菌体浓度为 10⁸/mL 的鲁氏酵母菌悬液 25mL,置于 30℃恒温箱中恒温。

2 结果与分析

2.1 未发酵糖蜜溶液的 HPLC 分析图

未发酵糖蜜溶液的 HPLC 图如图 1 所示。

根据 1.2.2 节提供方法,本实验最终确定 HPLC 优化条件检测糖蜜中糖分。

检测结果显示,糖蜜中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、蜜二糖、 α -1,6 半乳三糖、水苏糖、毛蕊糖的质量分数分别为

3.40%、5.51%、54.63%、0.84%、8.50%、0.75%、24.92%和 1.45%,表明其主要糖分为蔗糖,约占总糖的 55%,其次为水苏糖(25%)、棉子糖(8%)及其他糖类(12%)。

糖分的加标回收率计算公式为:加标回收率=(加标试样测定值-试样测定值)/加标量 $\times$ 100%,加标量回收率为 99.89%,在此实验条件下各糖分出峰时间稳定,基线噪音较小,线性关系良好。

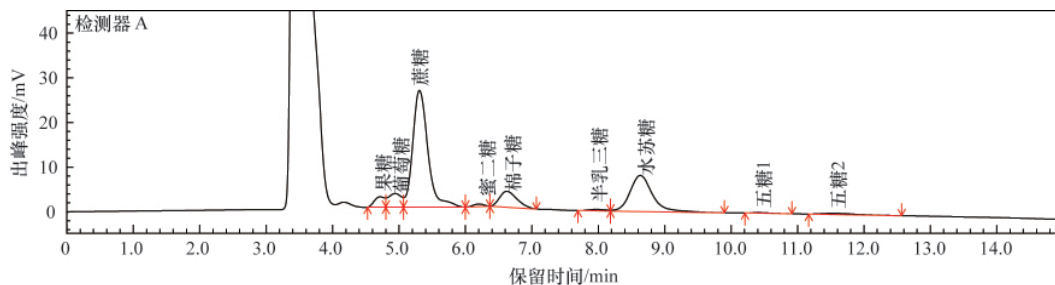


图 1 糖蜜溶液 HPLC 图

Fig. 1 HPLC map of molasses solution

2.2 5 种菌发酵结果

2.2.1 乳酸菌发酵糖液的结果

乳酸菌发酵糖液的 HPLC 图如图 2 所示,可知乳酸菌在 37℃条件下发酵 72h 后,蔗糖质量分数由 53%变为 47%,单糖质量分数升高,棉子糖、水苏糖没有分解趋势。

该结果与李宝玉等^[10]的“乳酸菌对碳源的选择利用理论”(果糖、蔗糖产气,葡萄糖、棉子糖、水苏糖均不产气)不相符合,分析其原因可能是糖蜜发酵液的微环境不利于乳酸菌的生长。由于乳酸菌对糖蜜中糖的利用没有选择性,所以不作为发酵菌种。

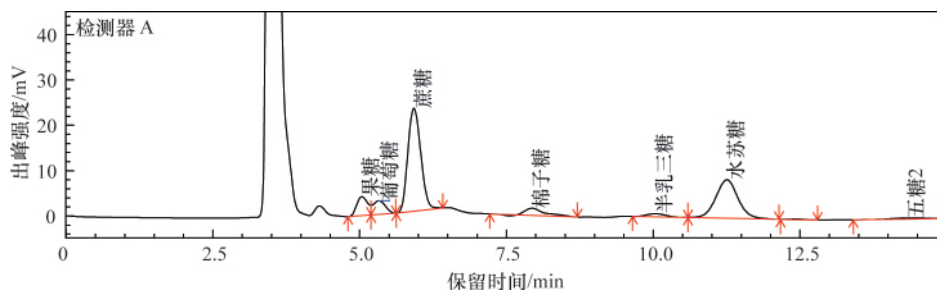


图 2 乳酸菌 HPLC 图

Fig. 2 HPLC map of lactobacillus

2.2.2 酿酒酵母发酵糖液的结果

酿酒酵母 A 发酵 28h 的糖液色谱图见图 3,图 4 为酿酒酵母 A 发酵糖分变化图,从图中可以看出,糖蜜中的蔗糖完

全消耗,水苏糖保留率为 88%,果糖和葡萄糖含量显著升高。图 5、图 6 为酿酒酵母 B 发酵 11h 的糖液色谱图及发酵糖分变化图,从图中可以看出,糖蜜中的蔗糖完全消耗,水苏糖也

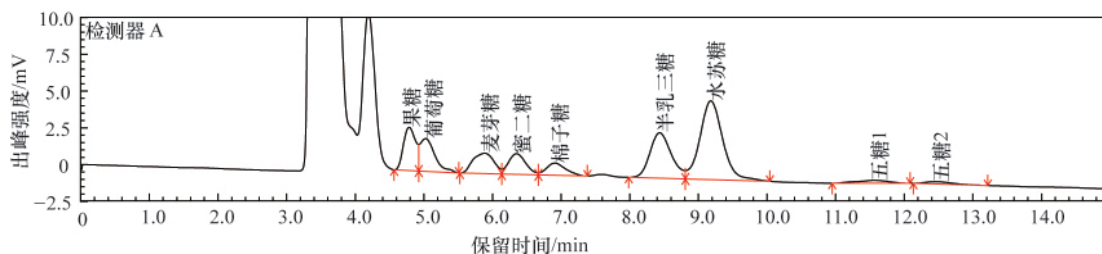


图 3 酿酒酵母 A 发酵 28h HPLC 图

Fig. 3 HPLC map of *Saccharomyces cerevisiae* A after 28h fermentation

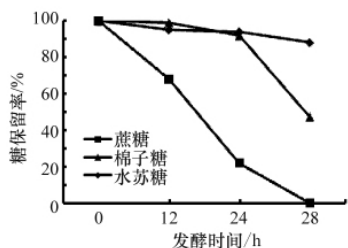


图4 酿酒酵母 A 发酵糖分变化图

Fig. 4 Map of sugar contents changes in *Saccharomyces cerevisiae* A

全部裂解为果糖和半乳三糖,棉子糖也大部分裂解。图7、图8为酿酒酵母C发酵24h的糖液色谱图及发酵糖分变化图,从图中可以看出,糖蜜中的蔗糖完全消耗,水苏糖保留率为91%,果糖和葡萄糖含量显著升高。对比3种酿酒酵母的发酵效果,酿酒酵母C在24h内就能使糖蜜中的蔗糖含量由54%变为0,并且水苏糖保留率较高,因此应该选择酿酒酵母C发酵糖蜜。

对酿酒酵母C发酵糖蜜的实验条件进行优化,确定最佳的发酵工艺条件为:糖蜜初始糖浓度9%,初始pH值6.5,接种酿酒酵母C的接种量3%,发酵温度30℃。发酵24h后糖蜜中糖分的各组成成分百分含量分别为:果糖9.25%、葡萄糖15.21%、蔗糖0、麦芽糖7.68%、蜜二糖6.93%、棉子糖12.98%、 α -1,6半乳三糖8.80%、水苏糖36.68%、毛蕊糖

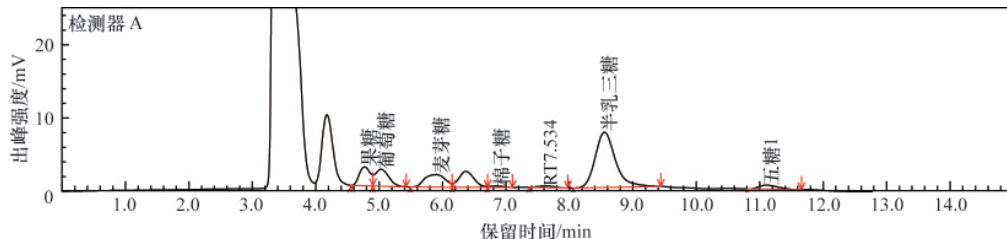


图5 酿酒酵母 B 发酵 11h HPLC 图

Fig. 5 HPLC map of *Saccharomyces cerevisiae* B after 11h fermentation

2.46%。蔗糖成分完全消耗,发酵液中功能性低聚糖的含量达到60.90%,发酵液中果糖和葡萄糖含量较高达到24.46%,发酵的重复稳定性高达95%以上。

鲁氏酵母具有能够发酵果糖、葡萄糖不能发酵蔗糖的性质,可以利用此性质来降低单糖含量。可以考虑先接种酿酒酵母C发酵糖蜜,24h后终止发酵,再接种鲁氏酵母发酵糖液中的单糖。

2.2.3 酿酒酵母C与鲁氏酵母发酵糖液的结果

图9为糖蜜中先接种酿酒酵母C发酵24h,然后终止发酵,再接种鲁氏酵母发酵48h的色谱图。最终发酵液中的单糖含量没有明显降低,鲁氏酵母在发酵液中没有发挥出消耗单糖的能力,究其原因可能是糖蜜溶液的微环境不适合鲁氏酵母的生长。

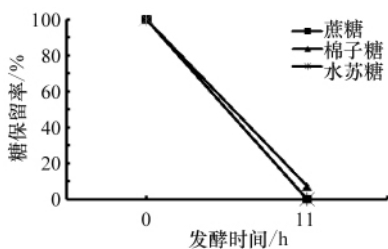


图6 酿酒酵母 B 发酵糖分变化图

Fig. 6 Map of sugar contents changes in *Saccharomyces cerevisiae* B

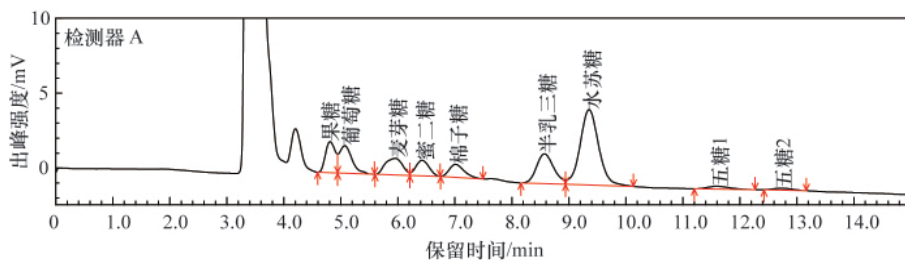


图7 酿酒酵母 C 发酵 24h HPLC 图

Fig. 7 HPLC map of *Saccharomyces cerevisiae* C after 24h fermentation

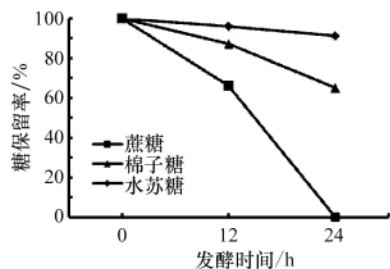


图8 酿酒酵母 C 发酵糖分变化图

Fig. 8 Map of sugar contents changes in *Saccharomyces cerevisiae* C

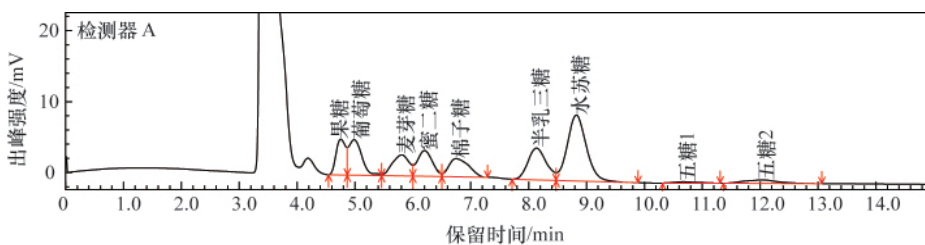


图9 酿酒酵母 C 发酵 24h 后接种鲁氏酵母发酵 48h HPLC 图

Fig. 9 HPLC map of *Saccharomyces rouxii* after 48-hour fermentation inoculated after 24-hour fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* C

微生物发酵的方法可去除糖蜜中含量最高的蔗糖,保留大部分水苏糖和棉子糖,对于发酵液中含量较高的单糖成分,可在之后的处理中采用工业色谱分离技术予以去除。

3 结论

(1) 在相关企业标准及大量摸索性试验的基础上,本实验最终确定了 HPLC 的优化条件,并检测出糖蜜中糖分为蔗糖,约占总糖的 55%,其次为水苏糖(25%)、棉子糖(8%)及其他糖类(12%)。

(2) 将乳酸菌添加到糖蜜溶液中,在 37℃ 条件下发酵 72h 后,蔗糖含量由 53% 变为 47%,单糖含量升高,棉子糖、水苏糖没有分解趋势。由于乳酸菌对糖蜜中糖的利用没有选择性,所以不作为发酵菌种。本实验还研究了 1 种酿酒酵母发酵糖蜜的情况,确定了最佳发酵糖蜜的菌株——酿酒酵母 C。并对酿酒酵母 C 发酵糖蜜的实验条件进行了优化,确定最佳的发酵工艺条件为,糖蜜初始糖浓度 9%,初始 pH 值 6.5,接种酿酒酵母 C 的接种量 3%,发酵温度 30℃。酿酒酵母 C 发酵 24h 后,蔗糖成分完全消耗,发酵液中功能性低聚糖的含量达到 60.90%,发酵液中果糖和葡萄糖含量较高,达到 24.46%,发酵的重复稳定性高达 95% 以上。

(3) 本实验研究了酿酒酵母 C 和鲁氏酵母共同发酵糖蜜的情况,但鲁氏酵母在发酵液中没有发挥出消耗单糖的能力,不予采用。对于发酵液中含量较高的单糖成分,可以在之后的处理中采用工业色谱分离技术予以去除。

参考文献 (References)

- [1] Arai S, Suzuki H, Fujimaki M, et al. Studies on flavor components in soybean P12-Phenolic acids in defatted soybean flour[J]. *Agricultural and*

Biological Chemistry, 1966, 30(4): 364-369.

- [2] 蒋丽华, 华欲飞. 大豆蜜糖中低聚糖的分离纯化 [D]. 无锡: 江南大学, 2007.

Jiang Lihua, Hua Yufei. Separation and purification of oligosaccharides from soy molasses[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2007.

- [3] Roberfroid M. Prebiotics: The concept revisited[J]. *The Journal of Nutrition*, 2007, 137(S2): 830S-837S.

- [4] Messina M J. Legumes and soybeans: Overview of their nutritional profiles and health effects[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1999, 70(3): 439S-450S.

- [5] Liu Y P, Zheng P, Sun Z H, et al. Economical succinic acid production from cane molasses by *actinobacillus succinogenes* [J]. *Bioresource Technology Technology*, 2008, 99(6): 1736-1742.

- [6] 励慧敏, 韩锦华. 大豆蛋白和大豆低聚糖在食品加工中的应用 [J]. 食品研究与开发, 2008, 29(7): 159-161.

Li Huimin, Han Jinhua. *Food research and development*, 2008, 29 (7): 159-161.

- [7] Koren D W, Duvnjak Z. Pure fructose syrup and ethanol production from high fructose corn syrup supplemented with Jerusalem artichoke juice[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 1990, 47(2): 117-125.

- [8] 宋宏哲, 蒋大海, 赵勇, 等. HPLC-ELSD 法测定大豆糖蜜中低聚糖的研究[J]. 中国油脂, 2008, 33(77): 77-79.

Song Hongzhe, Jiang Dahai, Zhao Yong, et al. *China Oils and Fats*, 2008, 33(77): 77-79.

- [9] 方伟辉. 大豆糖蜜分离及低聚糖成分生物净化的研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2004.

Fang Weihui. Isolation of the soybean molasses and the microbiological purification of the oligosaccharide composition [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2004.

- [10] 李宝玉, 李德发. 双歧杆菌和乳酸杆菌对不同碳水化合物利用能力 [J]. 中国饲料, 1999(18): 9-10.

Li Baoyu, Li Defa. *China Feed*, 1999(18): 9-10.

(责任编辑 岳臣)

·学术动态·

“中国古生物学会第 26 届学术年会”征文

中国古生物学会将于 2011 年 10 月 18—20 日在贵州召开“中国古生物学会第 26 届学术年会”。

征文范围: 古无脊椎动物学、微体古生物学、古植物和孢粉学、古脊椎动物学、古人类学、生物地层学、地球生物学、古生态学、古地理学以及古气候学、地史时期生物多样性、重大生物地质事件与环境变化、古生物化石数据库、古生物学教学与人才培养、博物馆与科普教育、古生物科技期刊与出版以及古生物化石保护等。

通信地址: 南京市北京东路 39 号 (210008) 中国古生物学会秘书处; 联系电话: 025-8328 2138; 传真: 025-8335 7026; 电子信箱: psc@nigpas.ac.cn。

会议网址: www.china-psc.org.cn/xhdt/detail.asp?newid=580&leibieid=42。