

甘蔗糖蜜总糖中提高蔗糖纯度的菌株分离鉴定及生物纯化性能*

Isolation of Strain for Raising Sucrose Purity in Sugarcane Molasses and Its Biological Purification

覃香香,周玉恒,蔡爱华,陈海珊,沈育伊,张厚瑞**

QIN Xiang-xiang, ZHOU Yu-heng, CAI Ai-hua, CHEN Hai-shan, SHEN Yu-yi, ZHANG Hou-rui

(广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所,广西植物功能物质研究与利用重点实验室,广西桂林 541006)

(Guangxi Key Laboratory of Functional Phytochemicals Research and Utilization, Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin, Guangxi, 541006, China)

摘要:从甘蔗糖厂周边环境采集污泥、土壤及污水样品,通过甘蔗糖蜜纯化发酵试验筛选提高甘蔗糖蜜总糖中蔗糖纯度的菌株,并对菌株进行形态观察、生理生化特征比较和 26SrDNA 基因序列同源性分析鉴定。结果筛选获得 1 株提高甘蔗糖蜜总糖中蔗糖纯度的菌株 m-6。菌株 m-6 纯化发酵 10h,甘蔗糖蜜中葡萄糖、果糖的去除比例分别为 96.5%、100%,蔗糖在糖蜜总糖中的纯度由初始的 55.6% 提高至 85.7%,菌株 m-6 对甘蔗糖蜜有良好生物纯化作用。菌株 m-6 属于库德毕赤酵母 (*Pichia kudriavzevii*)。

关键词:甘蔗糖蜜 生物纯化 库德毕赤酵母 蔗糖

中图法分类号:Q591.4,Q93-331 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2013)01-0040-04

Abstract: A new strain, *Pichia kudriavzevii* (m-6), isolated from sugar was isolated from refinery environments, and used to improve sugar purity in sugarcane molasses. Its morphological, physiological and biochemical characteristics were compared, and 26SrDNA gene sequence homology was conducted. High-pressure liquid chromatography elution curve of absorption compounds showed that several chromatographic peaks (glucose and fructose) were evidently diminished in biological purification of sugarcane molasses, suggesting that glucose and fructose were degraded by the new isolate during the cultivation process. Fermentation results of sugarcane molasses showed that sucrose purity was increased to 85.7% from 55.6%, and that removal rates of glucose and fructose were 96.5% and 100%, respectively. This results demonstrated that *Pichia* yeast provides an effective biorefinery approach to remove glucose and fructose, and improve sucrose purity. Biological purification can increase sucrose recovery from sugarcane molasses.

Key words: sugarcane molasses, biological purification, *Pichia kudriavzevii*, sucrose

收稿日期:2012-10-18

修回日期:2012-11-05

作者简介:覃香香(1980-),女,助理研究员,硕士,主要从事木质纤维素生物转化利用研究。

* 广西植物研究所科学研究基金(桂植业 NO.09001);广西自然科学基金项目(2010GXNSFB013043);广西自然科学基金项目(桂科青 NO.0991074)资助。

** 通讯作者,张厚瑞(1954-),男,研究员,主要从事功能糖的研究开发。

甘蔗糖蜜是制糖工业的主要副产物,存在于甘蔗糖蜜中不能回收的蔗糖约占蔗糖总量的 10%^[1]。我国 2011/2012 榨季约产蔗糖 1200 万吨^[2],约有 120 万吨蔗糖留在甘蔗糖蜜中无法结晶回收。甘蔗糖蜜的成分非常复杂,含有在加工蔗糖的过程中由蔗糖水解生成的单糖,即葡萄糖和果糖,另外还含有大量的钾、钠、钙、镁、硅等无机盐,以及色素、胶体等有机非糖成分抑制蔗糖结晶^[1]。为了提高蔗糖的回收率,人

们引入以阳离子树脂色谱柱为分离载体的模拟移动床装置,用以除去甘蔗糖蜜中的非糖成分^[3,4]。甘蔗糖蜜中含有大量的钙离子和镁离子,导致色谱树脂收缩严重,因而 Jean de Lataillade 等^[5]通过预处理除去甘蔗糖蜜中的钙离子和镁离子,然后通过色谱分离,这一工艺可以生产出 3 种可供选择的产品组合,分别是蔗糖、转化糖和非糖分。这种方法缺点是色谱分离同时获取 3 种组分,树脂的处理能力低;预处理脱钙和镁去除效果不理想,因为甘蔗糖蜜中含有大量的钾离子,钾又会将钙离子或镁离子从树脂上解吸附,因而无法实现彻底去除。美国路州大学糖业研究所对连续的模拟移动床的吸附分离特性、以及将它用于处理甘蔗糖蜜进行了详细的试验研究,结果色谱分离前甘蔗糖蜜中蔗糖纯度 45.8%,色谱分离提纯后蔗糖纯度提高至 75.9%^[6]。尽管色谱分离在甘蔗糖蜜净化中有一定的效果,但是色谱分离技术存在缺点:蔗糖是双糖,色谱分离后出峰位置与盐峰接近,为了获得高纯度的蔗糖,必须浓缩二次色谱分离,运行成本高。通过预处理同时去除糖蜜中非糖组分、色素、单糖组分等多个组分效率低;糖蜜中所含养分丰富,色谱分离过程糖度降低,色谱柱容易出现大量的微生物生长,滋生的微生物堵塞柱床,影响色谱仪连续运行,同时造成蔗糖部分损失。

非糖杂质固然是甘蔗糖蜜中蔗糖结晶的重要抑制物,但是蔗糖加工过程生成的单糖——葡萄糖与果糖,在甘蔗糖蜜中也同样抑制蔗糖的结晶。在去除非糖成分的色谱分离中,很难在有效控制纯化成本的前提下除去这些单糖组分,以促进蔗糖结晶回收率的提高。前期研究中我们发现自然环境中存在微生物可以优先消耗果糖和葡萄糖,之后再代谢蔗糖,而且代谢活性低,因而我们提出通过生物纯化方式提高甘蔗糖蜜中蔗糖纯度。微生物代谢蔗糖的第一步反应就是将蔗糖水解生成葡萄糖和果糖。如果微生物缺少蔗糖酶或蔗糖酶活性很弱,那么这种微生物虽然可以利用葡萄糖和果糖,却不能水解蔗糖或其降解活性低。利用这一原理,我们可以通过生物降解葡萄糖和果糖的方式,实现对蔗糖的生物纯化。目前未见用生物纯化方式提高甘蔗糖蜜中蔗糖纯度的相关报道。经查阅酵母菌种鉴定手册也发现自然环境中存在如伯塞特假丝酵母、地生隐球酵母、耐糖有孢汉逊酵母、长形拿逊酵母等微生物不代谢蔗糖^[7]。我们从甘蔗糖厂周边环境的样品中筛选到 1 株酵母菌,研究其提高甘蔗糖蜜总糖中蔗糖纯度的生物纯化效果,并鉴定其分类地位,为实现从甘蔗糖蜜中回收蔗糖提供参考。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

甘蔗糖蜜购于广西永福五州制糖有限公司,锤度 73。试验样品是从多个甘蔗糖厂周边环境采集的污泥、土壤及污水共 60 份。试验使用的主要试剂:蔗糖、尿素、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、酵母膏等购于汕头西陇化工厂,均为国产分析纯。试验使用的主要仪器与设备为高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司产品),电泳仪(Pharmacia 公司产品),PCR 仪(德国 Biometra personal 公司产品),凝胶扫描仪(美国 Bio-RAD 公司产品),冷冻干燥机(美国 Gene company 公司产品),Uvmini-1240 紫外/可见光分光光度计(日本岛津仪器有限公司产品),高效液相色谱仪:510 色谱仪、410 示差折光检测器(美国 Waters 公司产品)等。

1.2 试验方法

甘蔗糖蜜预处理是将甘蔗糖蜜用去离子水稀释至糖度 60,80℃ 保温 1h,离心收集上清液,并于 4℃ 冰箱中保藏。以后的试验都是使用预处理过的甘蔗糖蜜,并根据需要进行稀释。

1.2.1 活性菌株筛选方法

筛选活性菌株的培养基分别有 A、B、C 3 种。培养基 A:甘蔗糖蜜糖度 25,尿素 2g/L;培养基 B:甘蔗糖蜜糖度 25,尿素 2g/L,琼脂 20g/L;培养基 C:分析纯蔗糖,无氨基酵母氮源(YNB),琼脂 20g/L。所有发酵培养基灭菌过程中糖盐分开,灭菌温度 121℃,灭菌时间 20 min。菌株培养条件为温度 30℃,摇床转速 200r/min,培养基装液量 25ml/250ml 三角瓶,后面所有发酵培养也都按照该条件进行。菌株筛选过程是取试验样品 1g(液体取 1ml),添加至培养基 A 中,富集发酵至菌种出现浑浊后及时快速传代,连续传 5 代,取样划线于培养基 B 上,挑选单个菌落,将单个菌落点于培养基 C 上,挑选生长缓慢的菌落,进行糖蜜发酵,研究其蔗糖纯化性能。

1.2.2 活性菌株蔗糖纯化性能研究方法

将菌株在种子培养基中活化培养 12~15h。种子培养基是葡萄糖 50 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g/L, KH₂PO₄ 3 g/L, NH₄H₂PO₄ 3 g/L, 酵母膏 5 g/L, pH 值自然。

将培养得到的种子液于无菌水中洗涤 2 次,以 1% 的接种量接种于合成培养基培养。合成培养基是蔗糖 120g/L,葡萄糖 30g/L,果糖 30g/L, (NH₄)₂SO₄ 5g/L, KH₂PO₄ 1g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.5g/L, CaCl₂ · H₂O 0.1g/L, NaCl 0.1g/L, 酵母膏 0.5g/L。

连续取样,用高效液相色谱仪检测合成培养基中蔗糖、葡萄糖及果糖浓度的变化。

分别取糖度为 20、25、30、35、40、45 的甘蔗糖蜜,添加尿素 2g/L,活化菌株接种量 1%。培养 24h,发酵样品稀释至 1/100,采用分光光度比浊法于 600nm 波长处测定菌株细胞密度,分析活性菌株的耐糖特性。

取糖度 20 的甘蔗糖蜜(蔗糖含量 128.9g/L,约占总糖的 55.6%;其它杂糖含量 102.9g/L 约占总糖的 44.4%,其中葡萄糖 30.9 g/L,果糖 42.9 g/L),添加尿素 2g/L,活化菌株接种量 1%,纯化发酵 10h,采用高效液相色谱仪检测糖蜜中蔗糖、葡萄糖及果糖含量的变化。

蔗糖、葡萄糖及果糖的检测采用高效液相 Ca^{+} 型色谱柱子进行检测^[8]。发酵样品制备:发酵液离心,取上清液稀释 5 倍,取 10ml,添加 10mg 粉末活性炭、0.5g 阳离子交换树脂、1.0g 阴离子交换树脂,混匀制成样品。发酵液样品电导率小于 5us/cm,用 0.22 μ m 水系微孔滤膜过滤。

1.2.3 菌株鉴定方法

对纯化发酵筛选到的菌株 m-6 进行形态观察、生理生化特征鉴定和 26S rDNA 基因同源性分析。形态观察是用肉眼观察菌落的形态特征,并在显微镜下观察单菌落的细胞形态。生理生化特征鉴定是按照文献^[9]的方法进行。26S rDNA 基因同源性分析是提取菌株 m-6 的 DNA 并 PCR 扩增菌株 m-6 的 26S rDNA 的 D1/D2 区域^[10],将 PCR 扩增产物送到上海生物工程技术服务有限公司进行测序。用软件 MEGA3.1、Clustalx(1.83)、chromas 结合双相测序图谱中碱基效应峰对序列进行校正,以确定菌株 m-6 的 26S rDNA D1/D2 区域的核苷酸序列。将校正序列递交到 NCBI 中的 GenBank 核苷酸序列数据库中进行同源序列搜索,直接比较菌株 m-6 与已知酵母菌相应序列的相似程度,下载相似度为 100% 的基因序列,通过 DNAMAN 软件比对。构建进化树以鉴定菌株 m-6 的菌种归属。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选和纯化结果

不同来源样品经过初筛后分离纯化得到 10 个菌株,编号为 m-1、m-2、m-3、m-4、m-5、m-6、m-7、m-8、m-9、m-10。

甘蔗糖蜜纯化发酵 10h 后,10 个菌株发酵液的高效液相色谱检测结果(表 1)显示,菌株 m-6 蔗糖损失最少,蔗糖仅损失 5.8%,蔗糖在总糖中的含量由

原来的 55.6% 提高到 85.7%。甘蔗糖蜜中的葡萄糖和果糖基本被菌株 m-6 完全降解(图 1)。因而选择菌株 m-6 进行蔗糖纯化性能研究和鉴定。

2.2 菌株 m-6 的蔗糖纯化性能研究

菌株 m-6 在合成培养基中优先利用果糖和葡萄糖,当果糖和葡萄糖接近耗完时开始消耗蔗糖(图 2)。

表 1 不同菌株甘蔗糖蜜生物纯化的效果(发酵 10h)

Table 1 Effects of biological purification of sugarcane molasses in different isolates(10h fermentation)

菌株 Strain	蔗糖 Sucrose (g/L)	葡萄糖 Glucose (g/L)	果糖 Fructose (g/L)	蔗糖损失率 Sucrose purity (%)
m-1	57.5	2.0	8.6	55.4
m-2	31.4	2.5	2.3	75.6
m-3	21.0	2.4	5.5	83.7
m-4	74.3	17.9	35.6	42.4
m-5	56.1	14.8	14.5	56.5
m-6	121.4	3.1	0	5.8
m-7	77.1	2.1	2.0	40.2
m-8	50.4	6.1	6.6	60.9
m-9	53.8	2.7	4.0	58.3
m-10	41.2	0	0	68.0

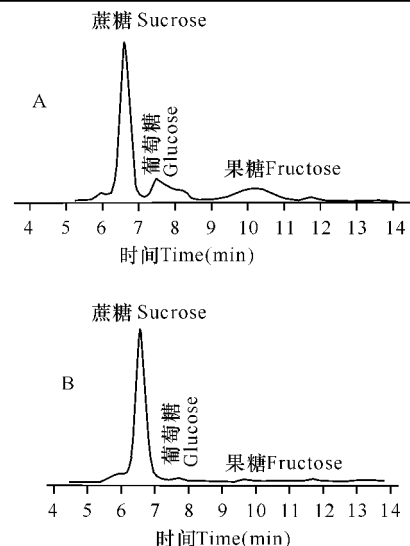


图 1 甘蔗糖蜜生物纯化前后的 HPLC 色谱

Fig. 1 HPLC elution curves of sugarcane molasses with or without biological purification

A: 生物纯化前; B: 菌株 m-6 生物纯化后。

A: Without biopurification; B: With biopurification by strain m-6 in 10h.

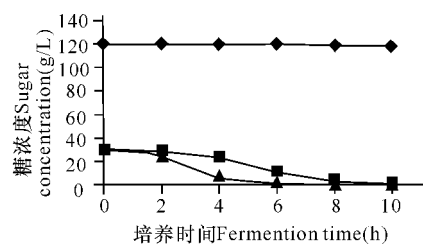


图 2 菌株 m-6 对蔗糖、葡萄糖及果糖的降解曲线

Fig. 2 The degradation curve of sucrose, glucose, fructose by strain m-6

◆: 蔗糖; ■: 葡萄糖; ▲: 果糖。

◆: Sucrose; ■: Glucose; ▲: Fructose.

菌株 m-6 在糖度 30 或 30 以上时细胞分裂速度受到显著抑制(图 3)。所以,应在糖度 25 下进行菌株 m-6 糖蜜纯化。

2.3 菌株 m-6 鉴定结果

菌株 m-6 的菌落表面干燥、有褶皱、白色(图 4), 细胞顶端出芽,呈椭圆或长条形(图 5)。菌株 m-6 在葡萄糖、乙醇、琥珀酸、D-果糖、尿素以及乳酸中菌体生长较多,在半乳糖、麦芽糖、甘露糖、海藻糖、密二糖、乳糖、松三糖、棉子糖、菊糖、淀粉、甲醇、D-阿拉伯糖、D-木糖、L-山梨糖、D-核糖、甜醇、D-山梨醇、甘油、肌醇、DL-苹果酸、 α -甲基-D-葡萄糖甙、硝酸钾以及浓度为 13%~14% 的氯化钠中菌体不生长,在蔗糖及 50% 葡萄糖中菌体微弱生长,在柠檬酸中菌体正常生长。

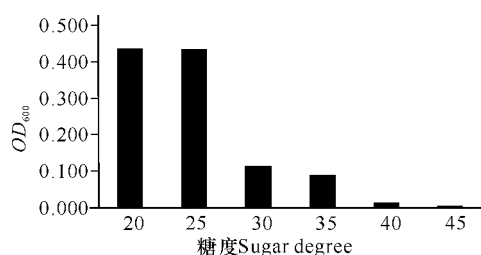


图 3 菌株 m-6 在不同糖度甘蔗糖蜜中的生长情况

Fig. 3 The growth of strain m-6 in different Brix of sugarcane molasses

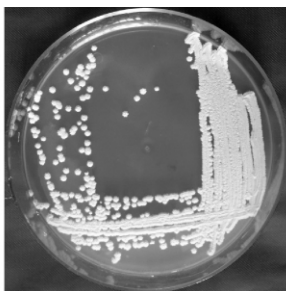


图 4 菌株 m-6 在葡萄糖平板上的菌落形态

Fig. 4 Colony morphology of strain m-6 in glucose medium

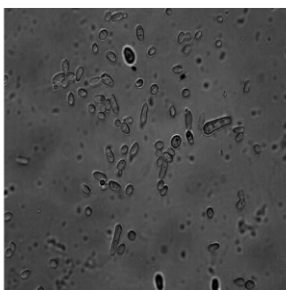


图 5 菌株 m-6 在显微镜下的细胞形态($\times 400$)

Fig. 5 Cellular morphology of strain m-6($\times 400$)

PCR 扩增获得菌株 m-6 26S rDNA D1/D2 区域的 DNA 片段 588bp, 菌株 m-6 的 26S rDNA D1/D2 区域的核苷酸序列与 GenBank 现有已知库德毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*) 的 5 个已经公布的核酸序

列(序列号 JF912083、FJ972209、FJ919397、HQ149322、FR870026)相似度达 100%。表明菌株 m-6 属于库德毕赤酵母。菌株 m-6 的 26S rDNA D1/D2 区域的核苷酸序列在 GenBank 的登记号为 GU129690。

3 结论

本研究从甘蔗糖厂周边环境取样,筛选获得优先利用葡萄糖和果糖等单糖,然后才开始利用蔗糖,而且分解蔗糖速度相对慢的菌株 m-6。菌株 m-6 纯化发酵后的甘蔗糖蜜中的蔗糖在总糖中含量由 55.6% 提高至 85.7%。将菌株 m-6 的 26S rDNA D1/D2 区域的核苷酸序列在 NCBI 中的 GenBank 进行比对可知,菌株 m-6 属于库德毕赤酵母。将菌株 m-6 应用到实际生产中进行甘蔗糖蜜生物纯化,菌株 m-6 就可以将甘蔗糖蜜中的单糖和非糖组分如 K 盐中的部分作为自身的营养成分,转变成细胞形式带走;该过程不仅提高蔗糖在总糖中的比例,同时起到一定的脱色脱盐净化目的。生物纯化是一种经济、高效的提高甘蔗糖蜜总糖中蔗糖纯度的手段,是值得重视的从甘蔗糖蜜中回收蔗糖的途径。

参考文献:

- [1] 霍汉镇. 现代制糖化学与工艺学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008.
- [2] 云南糖网. 2011 年国内外蔗糖产业发展概况[EB/OL]. 2012-01-11. <http://www.100ppi.com/forecast/detail-2012-01-11-17414.html>.
- [3] 曾鸿鹄, 朱义年, 梁延鹏, 等. 甘蔗糖蜜及其酒精废液资源化处理技术研究[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2012.
- [4] 爱军, 崔艳华, 韩立文. 现代分离技术在制糖工业中的应用[J]. 中国甜菜糖业, 2008(3): 23-25.
- [5] de Lataillade J, 于淑娟. 离子交换色谱法提取废蜜中糖分[J]. 中国甜菜糖业, 2002, 6: 27-28.
- [6] Carter M, Jensen J P. Process for the recovery of sucrose and/or non-sucrose components: US, 7763116 [P]. 2010-7-27.
- [7] J A 巴尼特, R W 佩恩著, D 亚罗. 酵母菌的特征与鉴定手册[M]. 胡瑞卿, 译. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991, 56-130.
- [8] 覃香香, 张厚瑞, 蔡爱华, 等. 东方伊萨酵母降解木糖醇发酵抑制物的研究[J]. 广西科学, 2010, 17(4): 358-362.
- [9] Barnett J A, Payne R W, Yarrow D. Yeasts: characteristics and identification[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1990: 683-684.
- [10] Zhang H R, Qin X X, Silvio S S, et al. Novel isolates for biological detoxification of lignocellulosic hydrolyate [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2009, 152(2): 199-212.