

发酵法分离提纯大豆糖蜜中低聚糖的研究

崔希庆^{1,2}, 刘畅^{1,2}, 董银卯², 何聪芬², 王昌涛^{2,*}

(1.东北农业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030;

2.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)

摘 要: 对3种酵母菌, 1种乳酸菌, 1种曲霉进行筛选实验, 选出了消耗蔗糖最多, 水苏糖、棉子糖保留率最高的1株酵母菌。经单因素试验证明, 其发酵大豆糖蜜的最佳条件为: 发酵初始pH值为5.0, 接种量为2%(V/V), 大豆糖蜜稀释8倍, 不添加任何生长因子, 28℃、180r/min的条件下发酵12h。大豆糖蜜发酵液中各糖分的保留率为: 蔗糖8.76%、棉子糖99.61%、水苏糖95.72%。

关键词: 低聚糖; 大豆糖蜜; 发酵; 保留率

Isolation and Purification of Oligosaccharides from Soybean Molasses through Fermentation

CUI Xi-qing^{1,2}, LIU Chang^{1,2}, DONG Yin-mao², HE Cong-fen², WANG Chang-tao^{2,*}

(1.Collge of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. Beijing Key Laboratory of Plant Resources Research and Development, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

Abstract: One strain of yeast that has the function of high consumption to sucrose, and high retention rate to stachyose and raffinose was screened from three stains of yeast, one strain of *Lactobacillus*, one strain of *Aspergillus*. The optimal condition for the fermentation of soybean molasses was initial pH 5, 2% inoculation amount, 1:8 of dilution for soybean molasses, 180 r/min shaking and fermentation at 28 °C for 12 h. The retention rates in hydrolysates of soybean molasses were 8.76% for sucrose, 99.61% for raffinose and 95.72% for stachyose under this optimal fermentation condition.

Key words: oligosaccharide; soybean molasses; fermentation; retention rate

中图分类号: TS261.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)23-0343-04

大豆糖蜜是生产醇法大豆浓缩蛋白过程中的副产物, 随着大豆浓缩蛋白的发展而日益受重视, 它是用乙醇来提取大豆蛋白质的过程中, 产生的一种棕色黏稠的浆状物质^[1], 低聚糖59%~62%, 粗蛋白6%~8%, 脂类物质5%~8%, 灰分7%~9%, 大豆皂苷6%~15%, 大豆异黄酮1.5%~2.5%, 酚酸4%~6%, 以及果胶质、阿拉伯半乳糖等多种糖类。由于大豆糖蜜物料的特殊性, 目前只作为价格低廉产品出售, 据估计, 全国每年大约会产生3~5万t大豆糖蜜^[2]。因此, 若能充分利用这一宝贵资源, 对其进行开发和利用, 一方面可减轻对环境压力, 另一方面也可大大提高其经济价值^[3]。

大豆低聚糖作为大豆糖蜜中最重要的物质之一, 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^[4-6], 它的功能性成分(棉籽糖和水苏糖)在糖蜜中被浓缩了数十倍, 从大豆糖蜜中提取大豆低聚糖是对大豆糖蜜最有效的利用。

普通型大豆低聚糖产品纯度低、蔗糖含量高, 其功能性低于其他类型的功能性低聚糖产品, 限制了其在一些特殊食品中的应用^[7]。大豆糖蜜作为发酵底物进行利用在国外已经有很多报道^[5-9]。本实验对微生物发酵糖蜜去除大豆低聚糖中的蔗糖的方法进行筛选优化, 从而提高功能性低聚糖的纯度, 降低生产时间。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

编号7号酵母菌保加利亚乳杆菌(LB)、红曲霉菌(*Monascus*)由北京工商大学生物化工实验室提供; 糖蜜

收稿日期: 2009-09-05

基金项目: 国家“863”计划项目(2007AA100404)

作者简介: 崔希庆(1984—), 男, 硕士研究生, 研究方向植物资源与分子生物学。E-mail: cuixiqing-2008@163.com

* 通讯作者: 王昌涛(1974—), 男, 讲师, 博士, 研究方向为植物化妆品的研发及功效评价。

E-mail: wangct@th.btbu.edu.cn

由北京富海科生物技术有限公司提供。

1.2 仪器与设备

LRH-250 生化培养箱 上海一恒科技有限公司；超净台 北京赛伯乐实验仪器有限公司；752 型紫外分光光度计 北京普析通用仪器有限公司；高效液相色谱仪 美国 Agilent 公司；HyPersil-NH₂ 色谱柱 大连依利特科学仪器公司；ELSD -2000ES 检测器 美国奥泰公司。

1.3 方法

1.3.1 培养基

酵母种子培养基：葡萄糖 2g、酵母膏 1g、蛋白胨 2g、蒸馏水 100ml，pH6.5~7.0；酵母无碳培养基：(NH₄)₂SO₄ 5g、KH₂PO₄ 1g、NaCl 0.1g、酵母膏 0.2g、蒸馏水 100ml；乳酸菌脱脂乳培养基：脱脂奶粉 100g、蒸馏水 1L，自然 pH 值；红曲饴糖培养基：饴糖波美度 6%~8%、蛋白胨 5%、可溶性淀粉 5%、冰醋酸 5%，pH 4~4.5；糖蜜发酵液：将大豆糖蜜稀释用去离子水稀释一定倍数，然后调节到各菌最适合 pH 值，110℃ 灭菌 10min。

1.3.2 糖的定量分析

采用高效液相色谱法分析，色谱条件：色谱柱：HyPersil-NH₂ 柱(250mm × 4.6mm)；检测器蒸发光检测器；流动相：乙腈-水(78:22)；流速：1.0ml/min；柱温：30℃；ELSD 检测器参数：载气流速 2.1L/min，漂移管温度 85℃。

1.3.3 菌株的筛选与驯化

首先，将 7 号酵母菌、保加利亚乳杆菌、红曲活化到最佳生长状况，然后在大豆糖蜜培养基中发酵 100h，然后经过 HPLC 检测，得到了对大豆糖蜜的发酵找到对蔗糖分解最高，对棉子糖水苏糖消耗最低的 7 号酵母菌，蔗糖分解率为 93.32%，棉子糖保留率和水苏糖的保留率分别为 83.96%、80.37%。为使 7 号酵母能耐高渗透压，适应高糖度的生长环境，同时能更大程度的满足纯化的目的，实验对其进行条件的优化。

2 结果与分析

2.1 3 种菌的发酵结果

酵母菌的最佳活化时间为 28℃，180r/min 活化 48h^[10]；红曲霉菌的最佳活化时间为 30℃^[11]，180r/min 活化 48h；保加利亚乳酸菌是在生化培养箱 37℃ 活化 20h^[12]。将活化好的菌分别接种于不同浓度的大豆糖蜜中，目的是使大豆糖蜜的糖度适合各种菌的生长条件，然后对其进行发酵，固定时间取样进行色谱分析。

2.1.1 乳酸菌对糖的分解情况

发酵液接种 6% 的乳酸菌，在 37℃ 下发酵，大豆糖蜜稀释 13 倍，培养时间为 78h，结果如图 1 所示。

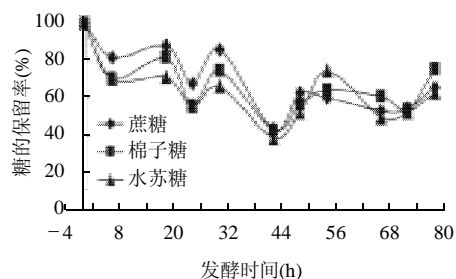


图1 乳酸菌发酵过程中糖蜜的糖分保留率的变化曲线

Fig.1 Retention curve of sugars in soybean molasses during fermentation with *Lactobacillus*

由图 1 可知，乳酸菌对大豆糖蜜中各糖的分解基本没有选择性，集中糖分的变化曲线基本一致，乳酸菌对各糖的利用能力很弱，在对糖分分析中，发现各糖的保留率不是一直降低的，在某些时间里的糖分保留率反而会增高，并且这种变化不是单一的某种糖的增高，而是整体的增高或降低，这就排除了实验操作和仪器的问题，分析其可能原因是乳酸菌在不同的发酵时间对水的需求情况有所变化，对样品有一定的浓缩；或者是因为在某一时间的发酵液的微环境对乳酸的生长造成一定的影响，使得死亡率增加细胞破裂，细胞内的内含物释放造成原本被吸收的糖分有又重新回到发酵液造成整体上的糖分的含量都变高。刘欣等^[13]用乳酸菌发酵生产高活性低聚糖实验中，乳酸菌对糖分具有很强的选择性，本实验未能得到证实。由于乳酸菌对各糖的分解没有选择性，并且对糖的利用能力较弱，在 80h 各糖的保留率为蔗糖 65.5%、棉子糖 75.42%、水苏糖 62.88%，没有达到实验目的，不作为优良菌株。

2.1.2 红曲霉菌对大豆糖蜜的利用情况

发酵液接种 6% 的红曲霉菌，在 30℃、180r/min 下发酵，大豆糖蜜稀释 16 倍，培养时间相对较长为 120h，结果如图 2 所示。

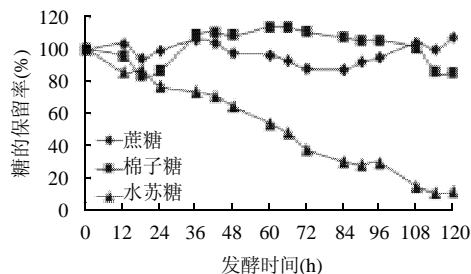


图2 红曲霉菌发酵过程中糖蜜的糖分保留率的变化曲线

Fig.2 Retention curve of sugars in soybean molasses during fermentation with *Monascus ruber*

由图 2 可知，与乳酸菌发酵有所不同，红曲虽然对糖的分解能力也很慢，但是对糖的分解有一定的选择性，各糖在不同时间内的分解情况是有区别的，在发

酵120h时,蔗糖保留率100.26%,棉子糖保留率85.76%,水苏糖保留率11.73%。虽然红曲霉对大豆糖蜜中低聚糖的分解有选择性,但是在分解过程中分子量大的功能性糖分先被降解,违背了实验目的,不作为优势菌。

2.1.3 7号酵母菌对大豆糖蜜的利用情况

发酵液接种3%的7号酵母菌,在28℃、180r/min下发酵,大豆糖蜜稀释13倍,培养时间较短为52h时各糖基本分解完全,结果如图3所示。

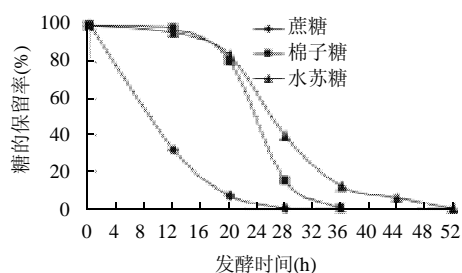


图3 7号酵母菌发酵过程中糖蜜的糖分保留率的变化曲线
Fig.3 Retention curve of sugars in soybean molasses during fermentation with yeast No.7

由图3可知,7号酵母菌对糖的分解能力很强,并且具有一定的选择性,和红曲霉菌不同,它先分解分子量小的糖分,满足降解非功能性低聚糖的要求,功能性低聚糖得到纯化,在发酵28h时,蔗糖就已经完全被降解,但是棉子糖和水苏糖的保留率只有15.38%和39.46%,所以需要进行进一步的优化处理。

2.2 最适条件的优化

2.2.1 最适pH值的确定

将7号酵母菌接种于酵母种子培养基中,28℃培养48h,然后将种子活化液分别接种于稀释13倍不同pH值的大豆糖蜜发酵液中,接种量3%,同样条件下培养然后HPLC分析糖分变化。

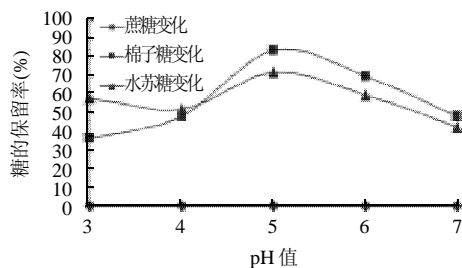


图4 pH值对发酵的影响
Fig.4 Effect of pH value on fermentation

由图4可知,pH值不同对酵母发酵的影响较大,16h时蔗糖都已经被完全分解掉,而pH5时水苏糖、棉子糖的保留率相对较高,分别为84.24%、78.63%,所以最适的pH值选择5。

2.2.2 最适接种量的确定

将活化好的7号酵母菌分别按不同的接种量2%~10%,接种于pH5的大豆糖蜜发酵液中,16h进行糖分的分析,结果如图5所示。

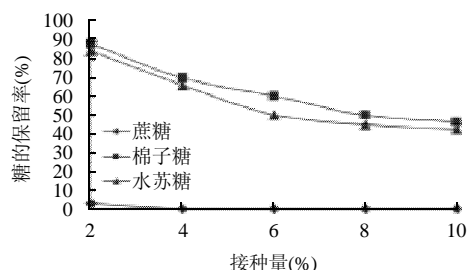


图5 接种量对发酵的影响
Fig.5 Effect of inoculation amount on fermentation

由图5可知,7号酵母菌对大豆糖蜜的利用能力很强,所以接种量过多,水苏糖和棉子糖的保留率有所下降,所以把接种量的最优值定在了2%,在此条件各糖的保留率分别为蔗糖2.67%、棉子糖88.81%、水苏糖84.91%。

2.2.3 最适糖蜜浓度的确定

将活化好的7号酵母菌按2%接种量接种于pH值都为5,但稀释倍数不同的大豆糖蜜发酵液中,发酵16h,结果如图6所示。

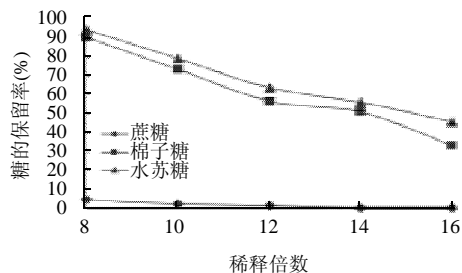


图6 糖蜜浓度对发酵的影响
Fig.6 Effect of sugar content in molasses on fermentation

由图6可知,7号酵母菌有一定的耐糖性,在稀释8倍的条件下,对蔗糖仍然有很强的分解能力,这样不但可以减少在浓缩过程中的消费,而且也节省了水资源,所以选择最适的大豆糖蜜稀释倍数为8。此时各糖的保留率分别为蔗糖4.37%、棉子糖90.57%、水苏糖94.42%。

2.2.4 最佳时间的确定

将活化好的7号酵母菌按2%接种量接种于pH值为5、稀释倍数为8的大豆糖蜜发酵液中,为了观察它的平行效果,分别发酵了两瓶。每2h取一次样,取到16h,然后进行糖含量的分析,结果如图7所示。

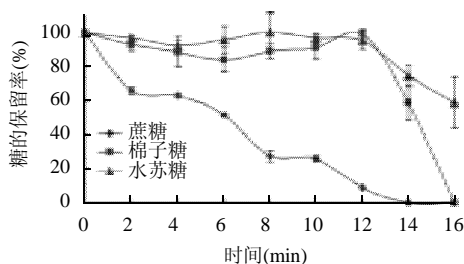


图7 发酵时间的影响

Fig.7 Effect of time on fermentation

由图7可知,不同时间对发酵的结果影响很大,7号酵母菌对发酵时间很敏感,所以在每次发酵过程中要严格控制时间,最终确定的时间为12h,各糖的保留率蔗糖8.76%、棉子糖99.61%、水苏糖95.72%。

2.3 发酵前后发酵液的液相色谱分析

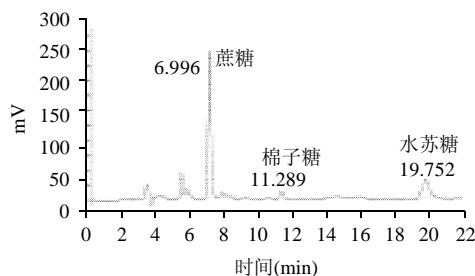


图8 发酵前发酵液的液相图

Fig.8 Liquid chromatogram of molasses solution before fermentation

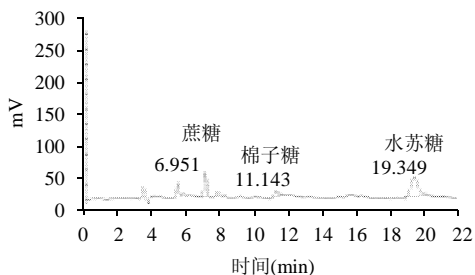


图9 发酵后发酵液的液相图

Fig.9 Liquid chromatogram of molasses solution after fermentation

图8色谱图中,3种糖的保留时间分别为:蔗糖6.996min、棉子糖11.289min、水苏糖19.752min。通过标样回归方程得到蔗糖、棉子糖、水苏糖占总糖含量分别是59.60%、7.91%、32.49%。虽然大豆糖蜜中总糖的含量约为60%,但其中蔗糖含量很高,占总糖的约60%,其含量严重制约着大豆低聚糖的功能性。

图9为优化条件下用7号酵母菌发酵的色谱图,与图8对比,可以明显的观察到,蔗糖的峰高明显下降,而棉子糖和水苏糖的高度几乎没有变化。蔗糖的分解率为91.24%,棉子糖和水苏糖的保留率分别为99.61%和

95.72%。满足去蔗糖的目的,同时对棉子糖和水苏糖的保留也非常明显。

3 结论

通过实验数据比较,得到了优良的菌株7号酵母菌,该菌不仅在高浓度的糖含量下保持着很高的生长能力,并且对蔗糖的分解和适应能力也非常强。通过菌种的筛选发酵条件进行优化,最终得到发酵大豆糖蜜的最佳条件为:发酵初始pH5.0,接种量2%,大豆糖蜜稀释8倍,不添加任何生长因子,28℃,180r/min,发酵的时间是12h。最终大豆低聚糖中各糖的保留率为蔗糖由6.14%上升到8.76%,棉子糖保留率由90.57%上升到99.61%,水苏糖由原来的94.42%上升到95.72%,同时发酵的时间降低了4h,稀释糖蜜的倍数由13倍浓缩到8倍,大大提高了工作效率,并且降低了生产成本,本实验对发酵法纯化功能性低聚糖,对大豆糖蜜这一宝贵资源进行了充分的利用,同时减少了它所带来的污染,为后期的分离提供保障。

参考文献:

- [1] ARAI S, SUZUKI H, FUJIMAKI M, et al. Studies on flavor components in soybean. Part 2. phenolic acids in defatted soybean flour[J]. Agr Biol Chem, 1966, 30(4): 364-369.
- [2] SIQUEIRA P F, KARP S G, CARVALHO J C, et al. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(17): 8156-8163.
- [3] 蒋丽华, 华欲飞. 大豆糖蜜综合利用[J]. 粮食与油脂, 2006(8): 12-14.
- [4] ROBERFROID M. Prebiotics: the concept revisited [J]. The Journal of Nutrition, 2007, 137(Suppl 2): 830S-837S.
- [5] MESSINA M J. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 1999, 70: 439S-450S.
- [6] LIU Y P, ZHENG P, SUN Z H, et al. Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes*[J]. Bioresource Technology, 2008, 99 (6): 1736-1742.
- [7] MALBASA R, LONCAR E, DJURIC M, et al. Effect of sucrose concentration on the products of *Kombucha* fermentation on molasses[J]. Food Chemistry, 2008, 108 (3) 926-932.
- [8] DUMBREPATIL A, ADSUL M, CHAUDHARI S, et al. Utilization of molasses sugar for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* mutant uc-3 in batch fermentation[J]. Applied And Environmental Microbiology, 2008, 74(1): 333-335.
- [9] PAPAGIANNI M, WAYMAN F, MATTEY M, et al. Fate and role of ammonium ions during fermentation of citric acid by *Aspergillus niger*[J]. Applied And Environmental Microbiology, 2005, 71(11): 7178-7186.
- [10] 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.
- [11] 刘辉, 张庆庆. 红曲发酵米酒工艺条件的研究[J]. 安徽工程科技学院学报, 2009, 24 (1): 30-32.
- [12] 赵宇星, 周惠明, 钱海峰. 酸豆乳生产菌种的驯化研究[J]. 食品科技, 2004(11): 28-30.
- [13] 刘欣, 张春红, 赵秀红, 等. 乳酸菌发酵法生产高活性大豆低聚糖的研究[J]. 食品工业科技, 2006(11): 137-139.