

一株高产 *D*-阿拉伯醇菌株的分离与筛选

王 乐, 惠 明, 尹艳丽, 黄继红*

(河南工业大学 生物工程学院, 郑州 450001)

摘 要: **目的** 分离和筛选出一株高产 *D*-阿拉伯醇菌株。**方法** 采用初筛和复筛手段, 利用纸层析法和高效液相检测方法, 从具有高浓度葡萄糖环境, 如葡萄干、红薯地土壤、蜂蜜、花粉等含糖量较高的样品中分离和筛选得到了一株高效转化葡萄糖生成 *D*-阿拉伯醇的优势菌株。**结果** 该菌株在初始葡萄糖浓度为 200 g/L 的培养基中, 30 °C, 摇瓶培养 120 h, *D*-阿拉伯醇的产量高达 82.4 g/L。根据常规形态鉴别, 生理生化实验测定, 以及核酸序列同源性比较分析, 证实筛选出的高产菌株 b-1 属于 *Candida parapsilosis*。**结论** 优势菌株 b-1 发酵产 *D*-阿拉伯醇的产率较高, 副产物较少, 具有一定的工业化应用前景。

关键词: *D*-阿拉伯醇; 葡萄糖; 酵母菌; 筛选; 鉴定

Isolation and screening of a strain for high *D*-arabitol production

WANG Le, HUI Ming, YIN Yan-Li, HUANG Ji-Hong*

(College of Biological Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

ABSTRACT: Objective To isolate and screen a high yield strain for *D*-arabitol production. **Methods** With the determination of paper chromatography and high performance liquid chromatography (HPLC), the fine strain for high concentration yield of *D*-arabitol from glucose had been separated and screened from high glucose environment, such as raisins, sweet potato to soil, honey, pollen samples, after the first and second screening. **Results** At the initial glucose concentration of 200 g/L on the culture medium, 30 °C, *D*-arabitol yield was 82.4 g/L after the fermentation of 120 h. According to the conventional morphological identification, determination of physiological and biochemical experiment, and the nucleic acid sequence homology comparison analysis, the high-producing strain b-1 was confirmed as *Candida parapsilosis*. **Conclusion** The yield of *D*-arabitol is high, the by-products are low in the fermentation by the screened strains b-1, which has a certain application prospect of industrialization.

KEY WORDS: *D*-arabitol; glucose; yeast; screening; identification

1 引 言

D-阿拉伯醇是一种天然五碳多元醇, 作为优良的甜味剂, 能预防龋齿形成、作为运输介质通过血脑

屏障, 同时亦是一种糖尿病患者的低热量食物, 具有广泛的市场需求, 应用于食品、医药和化工等领域^[1,2]。目前, *D*-阿拉伯醇生产方法主要是化学合成法和生物发酵法^[3]。

基金项目: 国家自然科学基金项目(21306040), 河南省科技厅自然科学基金项目(142102210412), (化工资源有效利用)国家重点实验室项目(CRE-2014-C-301)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (21306040), Natural Science Foundation of Science and Technology Agency of Henan Province (142102210412) and (Effective Utilization of Chemical Resources) State Key Laboratory Project (CRE-2014-C-301)

*通讯作者: 黄继红, 博士, 教授级高级工程师, 主要研究方向为农产品发酵工程。E-mail: Huangjihong1216@126.com

*Corresponding author: HUANG Ji-Hong, Doctor, Senior Engineer, Henan University of Technology Institute of Biological Engineering, Zhengzhou 450001, China. E-mail: Huangjihong1216@126.com

化学法合成法对反应设备要求较为严格, 高温高压的反应条件较为苛刻, 且会产生多种副产物^[4-6]。而生物发酵法是利用微生物体内的酶将葡萄糖转变为 D-阿拉伯醇, 生产工艺简单, 过程较温和, 易于控制, 无需苛刻的反应条件, 对环境危害较小, 目的产物单一且易分离提取^[7]。微生物生产 D-阿拉伯醇主要利用葡萄糖经过糖酵解(EMP)途径生成 6-磷酸葡萄糖酸再通过磷酸戊糖途径(PPP)代谢中间产物获得^[8]。当前微生物发酵生产 D-阿拉伯醇的产量和底物的转化率普遍较低且有较多副产物^[9]。

目前已报道的 D-阿拉伯醇生产菌株主要有曲霉属(*Aspergillus*)^[10]、毕赤酵母属(*pichia*)^[11]、德巴利氏酵母属(*Debaryomyces*)^[12]、汉逊酵母属(*Hansenula*)^[13]等。生物发酵法生产 D-阿拉伯醇主要是以廉价的葡萄糖为底物, 文献已报道的能够利用葡萄糖产生 D-阿拉伯醇的菌株及其发酵水平见表 1。

研究报道, 高渗酵母在高渗条件下能产生甘油、D-阿拉伯醇、赤藓糖醇等多元醇^[14]。底物浓度、氮源浓度、培养温度、通气量等发酵因素也会对 D-阿拉伯醇的转化率有影响^[15-17]。此外, 通气量、受体菌中 VHb 的表达量、非离子表面活性剂 Triton X-100 都对 D-阿拉伯醇的产生影响很大^[18]。Tokuoka、范光先等^[7,9]的研究也证实耐高渗酵母在高浓度葡萄糖存在的条件下更易产生 D-阿拉伯醇。当前, 产 D-阿拉伯醇菌株对底物葡萄糖的转化率普遍偏低, 也伴随着如甘油等其他多元醇副产物的生成^[19]。因此, 如何筛选和选育得到一株高效生产 D-阿拉伯醇的优势菌株显得十分重要。本研究首先从具有高浓度葡萄糖环境, 如葡萄干、红薯地土壤、蜂蜜、花粉等含糖量较高的样品中对产 D-阿拉伯醇菌株进行筛选和分离, 经光学显微镜观察和生理生化标准表征, 具有典型的酵母菌

特征, 进一步复筛选育后, 以期获得一株质量转化率高、副产物少、符合工业化生产的优良菌株, 为提高 D-阿拉伯醇的生物法生产水平奠定了一定的基础。

2 材料与方法

2.1 样品来源

食用葡萄干, 红薯地土壤, 菜园地土壤等。

2.2 实验试剂及设备

2.2.1 主要试剂

D-阿拉伯醇, 葡萄糖, 酵母粉, 磷酸二氢钾, 磷酸氢二铵, 硫酸镁, 青霉素, 琼脂, 酒石酸钾钠, 亚硫酸钠, DNS(3,5-二硝基水杨酸), 甘油, 硝酸银, 氨水, 氢氧化钠, 丙酮, 乙醇, 正丁醇, 苯酚, 麦芽糖, 木糖, 赤藓糖醇, D-木糖, 可溶性淀粉, 乳糖, 蔗糖, 麦芽糊精, 丙三醇。以上试剂均为分析纯, 购于北京化工厂。

(1) 纸层析显色剂

硝酸银丙酮-饱和氢氧化钠酒精溶液。溶液 A 的配置, 取饱和硝酸银溶液 0.1 mL, 加水溶解, 并用丙酮稀释至 20 mL。溶液 B 的配置, 将饱和水溶液 NaOH 用乙醇稀释至 0.5 mol/L。

(2) 纸层析展开剂流动相: 正丁醇: 苯酚: 水 (v:v:v)=40:10:10。

(3) DNS 法测还原糖含量^[20]。

2.2.2 主要设备

JY2502 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司); 电热恒温培养箱(上海森信实验仪器有限公司); 高压蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械有限公司); HZQ-X100 振荡培养箱(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司); WAY-2S 数字阿贝折光仪(上海仪电物理光学仪器有限公司); BH-2 Olympus 显微镜(奥林巴斯

表 1 发酵产 D-阿拉伯醇菌株及发酵结果
Table 1 Results of the strains for D-arabitol production and fermentations

菌株	菌属	D-阿拉伯醇浓度(g/L)	底物葡萄糖转化率(%)
<i>chodati</i>	<i>Endomycopsis</i>	57.0	43.4
<i>rouxii</i> NRRL	<i>Zygosaccharomyces</i>	83.4	47.7
<i>ohmeri</i>	<i>Kodamae</i>	82.2	40.6
<i>anomala</i>	<i>Hansenula</i>	45.9	45.9
<i>hansenii</i> ATCC	<i>Debaryomyces</i>	15.5	34.2
<i>polymorpha</i> DSM	<i>Hansenula</i>	18.8	14.0

光学仪器公司); T-6 可见—紫外分光光度计(北京新世纪电子技术开发有限公司); Agilent 1200 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司)。

2.3 培养基

2.3.1 富集培养基(1 L)

葡萄糖 50 g, 酵母膏 10 g, 磷酸二氢钾 4 g, 磷酸氢二铵 3 g, 硫酸镁 0.5 g, 另加入终浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的青霉素(抑制细菌生长), 定容至 1 L, 120 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 10 min。

2.3.2 AYC 培养基(1 L)

葡萄糖 150 g, 酵母膏 20 g, 磷酸二氢钾 6 g, 磷酸氢二铵 4 g, 硫酸镁 0.5 g, 琼脂 20 g, 定容至 1 L, 120 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 10 min。

2.3.3 种子培养基

富集培养基。

2.3.4 发酵培养基(1 L)

添加 200 g/L 葡萄糖的富集培养基。

2.3.5 酵母鉴定培养基

(1) 碳源同化培养基(1 L): 各种碳源 5 g, 酵母膏 0.2 g, 磷酸二氢钾 5 g, 磷酸氢二铵 5 g, 硫酸镁 0.5 g。定容至 250 mL, 120 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 10 min。

(2) 氮源同化培养基(1 L): 葡萄糖 20 g, 酵母膏 0.2 g, 磷酸二氢钾 1.5 g, 硫酸镁 0.5 g, 琼脂 20 g。定容至 250 mL, 120 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 10 min。

2.4 产 *D*-阿拉伯醇酵母菌种的分离与筛选方法

2.4.1 菌种分离

把采集的样品恰当稀释加入到含有富集培养基的三角瓶中, 30 $^{\circ}\text{C}$, 150 r/min, 培养 2 d, 然后将最终富集培养物涂布平板, 待长出单菌落后挑取较大的酵母状的菌落, 用无菌牙签点于平板纯化培养, 培养一段时间后, 再划线平板培养, 长出菌落后, 鉴定目的产物, 将此微生物菌株于斜面保存, 用于下一步的筛选。

2.4.2 摇瓶初筛

将菌种接种到发酵培养基中, 摇瓶培养 3 d, 温度 30 $^{\circ}\text{C}$, 转速 150 r/min, 测定发酵液中的 *D*-阿拉伯醇产量、残糖量、甘油副产物含量, 固形物含量, 选择 *D*-阿拉伯醇产量高, 固形物高, 残糖低, 且副产物少的菌株进行下一步复筛。

2.4.3 摇瓶复筛

将初筛所得菌株接种到发酵培养基中培养, 30 $^{\circ}\text{C}$, 150 r/min, 培养 3 d, 测定发酵液的菌体浓度、*D*-阿拉伯醇量、残糖量、可溶性固形物、甘油含量。

重复两次试验, 选取具有稳定性状、*D*-阿拉伯醇产量较高、甘油副产物较少的菌株作为目的菌株。

2.5 菌种鉴定

2.5.1 菌落形态观察

将目的菌株接种于 ACY 平板固体培养基上, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 3 d 后观察其固体菌落特征。

2.5.2 细胞形态观察

取适量目的菌株的菌落制成菌悬液, 滴少量于洁净的载玻片上, 盖上盖玻片, 在光学显微镜下观察其细胞形态, 必要时可染色观察。

2.5.3 生理生化实验

取适量目的菌株进行碳源同化实验, 观察所选目的菌株在含麦芽糖、乳糖、蔗糖、赤藓糖醇、L-核糖、木聚糖、麦芽糊精、可溶性淀粉、*D*-山梨醇、丙三醇培养基中生长情况。

2.5.4 26S rDNA 的 PCR 扩增及序列分析^[21]

2.6 发酵液成分鉴定

2.6.1 菌体浓度

发酵液经适当稀释(100 倍)后在 640 nm 波长下测其吸光度。取发酵液 50 mL, 离心 10 min, 转速 2500 r/min, 去上清液, 用去无菌水洗涤后重新离心, 重复 2-3 次, 于 50 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 20 h 后称重, 测得的菌体干重, 得到菌体浓度。

2.6.2 可溶性固形物

取发酵液 50 mL, 经离心后取上清(转速 3500 r/min), 用阿贝折光仪测定法检测发酵液中可溶性固形物含量。在 20 $^{\circ}\text{C}$ 温度下, 测量发酵液的折光率。

2.7 产物鉴定

2.7.1 *D*-阿拉伯醇纸层析法分析^[13]

2.7.2 高效液相色谱法测定发酵液中葡萄糖、*D*-阿拉伯醇和甘油含量

高效液相色谱仪: Agilent 1200 型(安捷伦(中国)科技有限公司), 色谱柱 Sugar-pak 6.5 mm $\times$ 300 mm, 5 μm 糖柱(沃特斯(中国)科技有限公司), 柱温 80 $^{\circ}\text{C}$, 流动相为超纯水, 流速为 0.5 mL/min, 进样量为 15 μL , 检测器(RID, ShodexRI100)。

3 结果与讨论

3.1 产 *D*-阿拉伯醇菌株的筛选

3.1.1 富集培养

将采集的样品(a-葡萄干、b-废弃红薯地、c-菜园

土壤)进行富集培养, 观察富集培养基中菌体的外观形态, 结果如表 2 所示。根据底部沉淀大量白色乳状菌落, 以及菌体的形态等多种因素, 初步断定可能是酵母菌类。

3.1.2 平板筛选

将富集培养液涂布于平板, 观察涂布培养过程

中菌体的外观形态, 结果如表 3 所示。从培养皿上白色乳状菌落, 可初步断定为酵母菌类, 另外还发现有霉菌大量繁殖, 因此将酵母菌与霉菌进行牙签划线和划线纯化分离筛选, 经过纯化和分离, 得到了单一的酵母菌落。

表 2 富集培养筛选结果
Table 2 Results of the enrichment culture screening

筛选方法	样品	结果显示
富集培养	葡萄干	上边缘有白色+黑色乳状物, 且有黑毛, 液体黄色稍深
	红薯地土壤	上边缘有白色乳状物, 液体鹅黄色, 透亮
	菜园地土壤	上边缘有白色乳状物, 且有橘红色物体, 液体黄色稍深

表 3 涂布培养筛选结果
Table 3 Results of the coated culture screening

筛选方法	样品	结果显示
涂布培养	葡萄干	少量白色乳状湿润菌落, 大部分被毛状白色菌落覆盖
	红薯土壤	大量(满屏)白色乳状菌落, 且较湿润
	菜园土壤	大量白色毛状菌落, 部分是黑色, 在间隙夹杂少量面积白色乳状湿润型菌落(很零散)
牙签纯化培养	葡萄干	以牙签点过的地方为起始点, 长有满屏白色霉菌
	红薯土壤	牙签点过的地方小面积白色乳状菌落且较湿润, 边缘有霉菌菌落
	菜园土壤	牙签点过的地方有大面积浅褐色乳状菌落且较湿润, 部分此菌落 长有黑色毛状霉菌(很零散)
划线纯化培养	葡萄干	菌体大量为白色, 不透明较粘稠, 中间有凸起且易被挑起
	红薯土壤	牙签点过的地方小面积白色乳状菌落且较湿润
	菜园土壤	牙签点过的地方有大面积浅褐色乳状菌落且较湿润

3.1.3 摇瓶发酵初筛

将平板分离得到的菌株进行摇瓶初筛培养, 发酵结果如图 1, 2 所示。筛选得到了两株 *D*-阿拉伯醇产量较高且副产物较少的菌株, 结果见表 4。

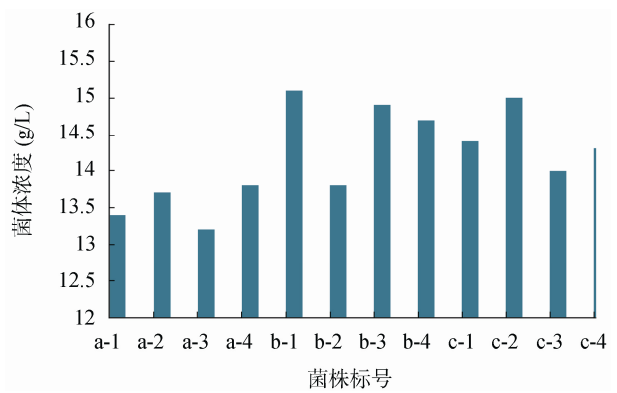


图 1 发酵结束后菌体的浓度
Fig. 1 Results of cell concentrations after fermentation

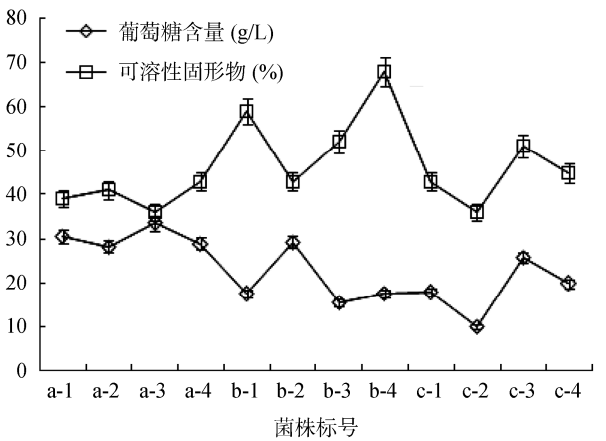


图 2 发酵液中葡萄糖和可溶性固形物(Brix)含量的结果
Fig. 2 Results of glucose and soluble solids content in the fermented liquid

通过对样品发酵液菌体浓度的测定, 可以看出菌株 b-1、b-3、b-4、c-2 的菌体浓度较高, 均在 15 g/L

表 4 *D*-产阿拉伯醇菌株的初筛结果
Table 4 Results of first screening of strains for *D*-arabitol production

菌株编号	可溶性固形物含量*	发酵液残糖量(g/L)	菌体浓度(g/L)	菌种来源	纸层析中 <i>D</i> -阿拉伯醇含量
a-1	39	30.6	13.54	葡萄干	+
a-2	41	28.1	13.72	葡萄干	++
a-3	36	33.4	13.22	葡萄干	+
a-4	43	28.9	13.81	葡萄干	+
b-1	59	15.9	15.08	红薯地土壤	+++
b-2	43	29.2	13.79	红薯地土壤	++
b-3	52	15.3	14.85	红薯地土壤	++
b-4	68	17.5	14.43	红薯地土壤	+++
c-1	43	17.6	14.40	菜园地土壤	++
c-2	36	15.8	1.498	菜园地土壤	++
c-3	51	25.6	1.401	菜园地土壤	+
c-4	45	19.7	1.428	菜园地土壤	+

* 发酵结束后离心取上清, 测量可溶性固形物含量

左右(图 1), 说明这四种菌株在产 *D*-阿拉伯醇发酵环境中的生长良好, 目的产物发酵条件适宜。

通过测定发酵结束后测定残糖的含量, 可以看出菌株 b-1、b-3、b-4、c-2 对葡萄糖的利用能力较高, 残糖剩余量较少(图 2)。其中菌株 b-1 和 c-2, 在 150 g/L 的葡萄糖发酵底物下, 残糖含量不足 15 g/L, 说明菌株 b-1 和 c-2 对葡萄糖的耐受力和代谢能力较高, 具有高产 *D*-阿拉伯醇的潜力。测定发酵液中可溶性固形物的含量, 可得菌株 b-1、b-3、b-4 的固形物含量较高, 分别为 59%, 52%和 68%, 而葡萄糖的含量相对较少, 为 15~17 g/L(图 2)。因此, 在一定程度上可反映出 b-1、b-3、b-4 三株菌具有较好的葡萄糖代谢和 *D*-阿拉伯醇生产能力。

将平板分离得到的菌株摇瓶培养 3 天后, 对发酵初筛结果进行测定, 结果如表 4 所示。由表 4 的结果可知, 菌株 b-1、b-4 的发酵液中可溶性固形物含量较高、残糖较低, 且 *D*-阿拉伯醇产量较高、副产物少, 因此选取这两株菌进行进一步复筛。

3.2 *D*-阿拉伯醇菌株的定性分析

3.2.1 菌株发酵培养后主要成分的纸层析鉴定

取 b-1、b-4 菌株发酵液适量进行纸层析定性定量分析, 以初步观察发酵液中 *D*-阿拉伯醇的含量。将处理好的单一标样与混合标样点样于层析纸上, 置于层析缸中进行纸层析。层析结束后自然晾干, 用饱和硝酸银丙酮溶液-氢氧化钠酒精溶液进行显色处理, 显色后显色点颜色为棕色或黑色, 显色结果见图 3。

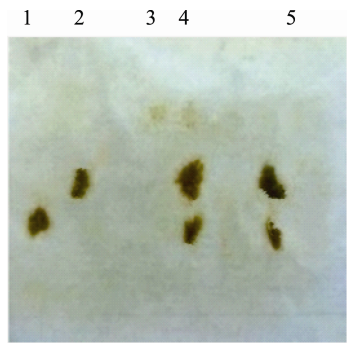


图 3 b-1、b-4 纸层析法测发酵液中 *D*-阿拉伯醇的结果

Fig. 3 Results of *D*-arabitol in fermented liquid by the strains of b-1, b-4 with the paper chromatography test
注: 1.葡萄糖标样 2.甘油标样 3.*D*-阿拉伯醇标样 4.红薯地土壤 b-1 发酵液 5.红薯地土壤 b-4 发酵液

根据纸层析法的显色反应原理, 可从显色点的迁移率和大小初步判断糖醇的种类和产量^[15]。由图 3 中的显色颜色深浅结果可知, 红薯地土壤 b-1 发酵液较红薯地土壤 b-4 发酵液所产 *D*-阿拉伯醇含量稍高。

3.2.2 菌株主要代谢产物的定性分析

采用高效液相色谱法对菌株的主要代谢产物进行进一步鉴定, 结果如图 4、5 所示。从左至右分别是甘油(保留时间 7.3 min); *D* 阿拉伯醇(保留时间 9.2 min); 葡萄糖(保留时间 9.9 min)。由图 4 可知, 通过比对 *D*-阿拉伯醇、葡萄糖、甘油的保留时间, 发酵液中的主要成分为 *D*-阿拉伯醇, 并伴随少量的甘油生成。由图 5 可知, 通过对菌株 b-1 的发酵液中添加 *D*-阿拉伯醇标准品后, 色谱图中没有新的峰形成,

而 *D*-阿拉伯醇峰面积和峰高都增大的结果, 可以确定菌株 b-1 的主要代谢产物为 *D*-阿拉伯醇。

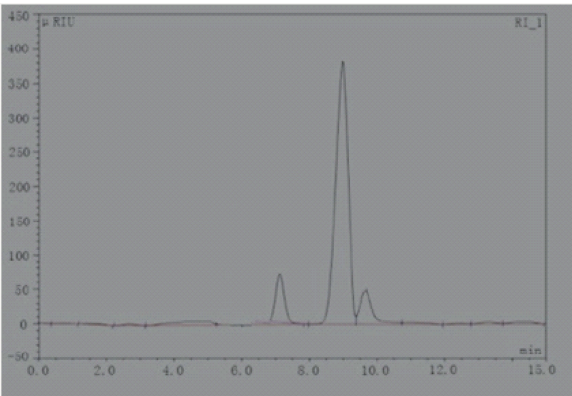


图 4 菌株 b-1 的发酵液 HPLC 图
Fig. 4 HPLC image of fermented liquid by the strain b-1

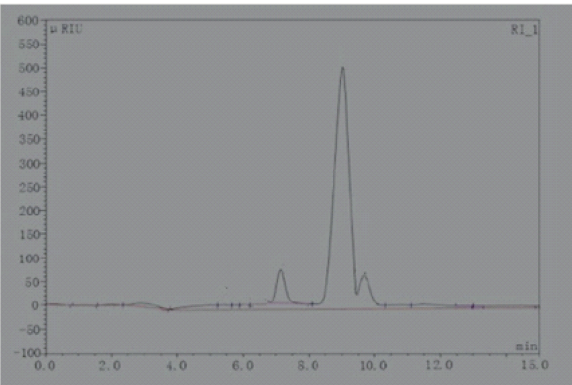


图 5 添加 *D*-阿拉伯醇标准品的发酵液 HPLC 图
Fig. 5 HPLC image of fermented liquid added *D*-arabitol standard

3.3 *D*-阿拉伯醇菌株的定量分析

从保存 b-1、b-4 菌株的斜面培养基中挑去一环, 接于富集培养基摇瓶复筛培养 3 d, 每组重复做两组实验, 测定其发酵液菌体浓度、*D*-阿拉伯醇、残糖量、甘油的含量, 结果如表 5 所示。由表 5 可知, 菌株 b-1 的 *D*-阿拉伯醇产量较高, 且甘油副产物较低, 因此

选该菌株 b-1 做最终目的菌株。

3.4 目的菌株形态观察鉴定

3.4.1 菌株显微镜观察

如图 6 所示, 菌落特征呈圆形, 边缘整齐, 乳白色粘稠状。如图 7 所示, 菌株 b-1 具有典型的酵母菌细胞特征, 细胞呈椭圆形, 透亮, 为两端芽殖, 无子囊孢子。

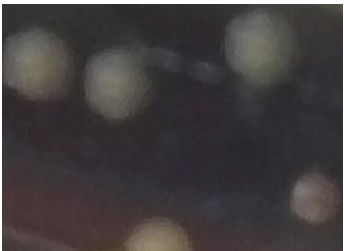


图 6 菌落的照片
Fig. 6 Image of the colony

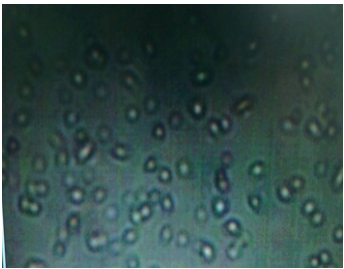


图 7 菌株 b-1 的显微镜照片
Fig. 7 Microphotograph of the strain b-1

3.4.2 生理生化特征

将所得的目的菌株进行碳源同化实验, 从保存的斜面培养基上取适量菌体, 接种于含有麦芽糖、乳糖、蔗糖、赤藓糖醇、木糖醇、麦芽糊精、可溶性淀粉、*D*-山梨醇、丙三醇等的培养基中, 观察菌株生长情况。由表 6 结果可知, 菌株 b-1 能够发酵葡萄糖和蔗糖; 能将葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、甘油、木糖醇、*D*-山梨醇等同化, 在有葡萄糖、蔗糖、甘油、木糖醇的培养基中生长比较好。初步鉴定为酵母菌。

表 5 高效液相测定发酵 3d 后发酵液成分含量
Table 5 The component content of the fermented liquid after 3 d by HPLC

菌株编号	残糖量(g/L)	菌体浓度(g/L)	甘油(g/L)	<i>D</i> -阿拉伯醇(g/L)	葡萄糖消耗量(g/L)	阿拉伯醇产率(%)
b-1-1	14.3	0.572	10.3	82.4	185.7	44.5
b-1-2	16.5	0.554	8.7	80.8	183.5	44.0
b-4-1	25.6	0.501	6.8	63.6	174.4	36.5
b-4-2	40.0	0.487	2.3	61.7	160.0	38.6

表 6 菌株的生理生化特征
Table 6 Physiological and biochemical characteristics of the strain

组别	实验项目	生长情况
1	麦芽糖	-
2	乳糖	-
3	蔗糖	++
4	赤藓糖醇	-
5	木糖醇	++
6	麦芽糊精	-
7	可溶性淀粉	-
8	D-山梨醇	+
9	丙三醇	++

注: “+”表示生长良好; “-”表示生长较差

3.4.3 26S rDNA 序列分析

通过 PCR 方法扩增酵母菌的 26S rDNA D1/D2 区, 目的基因片段长度为 511 bp。采用 BLAST 和 ClustalX 程序与 GenBank 数据库中已收录的酵母 26S rDNA D1/D2 区序列比对, 根据搜索结果, 选取相似性较高的酵母菌菌种的相关序列进行分析。结果表明, 菌株 b-1 的 26S rDNA D1/D2 区序列与近平滑假丝酵母 *Candida parapsilosis* 相似性在 99%以上。因此可以认定菌株 b-1 为近平滑假丝酵母 *Candida parapsilosis*。

4 结 论

本文利用高糖富集培养技术, 从葡萄干和土壤中筛选出 12 株耐高渗透性的酵母菌, 经过筛选分离得到了一株 D-阿拉伯醇产量较高的酵母菌株 b-1。用 HPLC 对该菌株的发酵产物进行分析, 确定了主产物为 D-阿拉伯醇。该菌株在初始葡萄糖浓度为 200 g/L 的培养基上, 30 ℃摇瓶培养 120 h 后, D-阿拉伯醇的产量达 82.4 g/L, 对葡萄糖的转化率可达 44.5%, 存在少量甘油副产物, 约 8.7 g/L。根据常规形态鉴别, 生理生化实验测定, 以及核酸序列同源性比较分析, 证实筛选出的优势菌株 b-1 属于 *Candida parapsilosis*。

参考文献

[1] 蔡莉, 张杨, 朱宏阳, 等. 1 株产 D-阿拉伯糖醇的菌株的分离筛选及鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(1): 23–26.
Cai L, Zhang Y, Zhu HY, *et al*. Isolation and identification of a novel D-arabitol-producing strain [J]. Food Ferment Ind, 2009, 35(1): 23–26.

[2] 杨远志, 杨海军. 功能性糖醇[J]. 精细与专用化学品, 2004, 12(1): 11–12
Yang YZ, Yang HJ. Functional sugar alcohol [J]. Fine Specialty Chem, 2004, 12(1): 11–12.

[3] 周日尤. 国内外多元醇的市场和应用[J]. 化学中间体, 2003: 12–15.
Zou RY. The domestic and overseas market and application of polyols [J]. Chem Intermediat, 2003: 12–15.

[4] 张丽丽. 高产 D-阿拉伯糖醇酵母菌株的筛选及其发酵条件的研究[D]. 无锡:江南大学, 2009: 1–44.
Zhang L L. Screening of yeast strains and fermentation conditions for hight yield production of D-arabitol[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2009: 1–44.

[5] 江宁, 贺鹏, 卢大军, 等. 酵母细胞转化葡萄糖制备阿拉伯糖醇的方法:中国专利, CN1124349C[P]. 2003: 10–15
Jiang N, He P, Lu DJ, *et al*. The preparation of D-arabitol by yeast from glucose: Chinese patent, CN1124349C [P]. 2003: 10–15

[6] 宋卫斌. D-阿拉伯醇产生菌的选育、工艺优化及其关键酶基因的克隆、表达 [D]. 杭州: 浙江大学, 2011: 2–3
Song WB. Screening of a novel D-arabitol-producing strain, optimization of D-arabitol production conditions and clone and expression of related key enzyme gene[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2011: 1–53.

[7] Toyoda T, Ohtaguchi K. Selection of Kluyveromyces yeasts for the production of D-arabitol from Lactose [J]. J Chem Engin Japan, 2009, 42: 508–511.

[8] 王正祥, 诸葛健. 酵母细胞渗透压调节及甘油代谢[J]. 生物工程进展, 1999, 19(5): 34–39.
Wang ZX, Zhuge J. Osmotic regulation and glycerol metabolism in yeast [J]. Biol Engin Progress, 1999, 19(5): 34–39.

[9] 范光先, 诸葛健, 徐成. 高浓度盐对耐高渗酵母产多元醇的影响[J]. 工业微生物, 2001, 31(1): 1–3.
Fan GX, Zhuge J, Xu C. Effects of high concentration of salts on polyol production by osmophilic yeasts [J]. Ind Microbiol, 2001, 31(1): 1–3.

[10] 张树政, 王惠莲, 杨廉婉. 耐高渗透压酵母产生甘油及阿拉伯糖醇的研究 II *Hansenula arabitolgenes* 产生阿拉伯醇的条件 [J]. 微生物学, 1963, 9(2): 134–139.
Zhang SZ, Wang HL, Yang LW. Studies on the production of glycerol and arabitol by osmophilic yeasts II Arabitol production by *Hansenula arabitolgenes* fang [J]. Microbiology, 1963, 9 (2): 134–139.

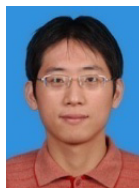
[11] Ruijter GJG, Visser J, Rinzema A. Polyol accumulation by *aspergillus oryzae* at low water activity in solid-state fermentation [J]. Microbiology, 2004, 150: 1095–1101.

[12] Bernard EM, Christiansen KJ, Tsang SF, *et al*. Rate of arabitol

- production by pathogenic yeast species [J]. J Clin Microbiol, 1981, 14: 189–194.
- [13] 李泽. 产 *D*-阿拉伯醇酵母菌株的筛选及发酵条件的研究[D]. 济南: 山东轻工业学院, 2012.
- Li Z. Screening of yeast strains and fermentation conditions for the production of *D*-arabitol[D]. Jinan: Shandong Institute of Light Industry, 2012.
- [14] Escalante J, Caminal G, Figueredo M, *et al.* Production of arabitol from glucose by *Hansenula polymorpha* [J]. J Ferment Bioeng, 1990, 70(4): 228–231.
- [15] Ingram JM, Wood WA. Enzymatic basis for *D*-arabitol production by *saccharomyces rouxii* [J]. J Bacteriol, 1965, 89: 1186–1194.
- [16] Caminal B, Yoshikiyo S, Michael S. Production of *D*-arabitol by a newly isolated *zygosaccharomyces rouxii* [J]. Soc Ind Microbiol, 2007, 34: 519–523.
- [17] Povelainen M, N. Miasnikov A. Production of *D*-arabitol by a metabolic engineered strain of *Bacillus subtilis* [J]. J Biotechnol, 2006, 1: 214–219.
- [18] 尤翠萍, 张梁, 丁重阳. 表面活性剂对 *D*-阿拉伯糖醇发酵的影响[J]. 生物加工过程, 2011, 9(2): 18–22.
- You CP, Zhang L, Ding CY. Effect of surfactants on production of *D*-arabitol by *Debaryomyces hansenii* [J]. Biological Process, 2011, 9(2): 18–22.
- [19] 余秉琦, 诸葛健. 酵母细胞对高渗环境的适应与胞内甘油累积[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(2): 25–28.
- Yu BQ, Zhuge J. Hyper osmoadaptation of yeast cells and intracellular accumulation of glycerol [J]. Chin J Biotechnol, 2003, 23(2): 25–28.
- [20] Wang L, Tang P, Yuan QP, *et al.* Multi-batches fermentation of xylitol production by *Candida tropicalis* immobilized in polyurethane foam as carrier [J]. Carbohydr Polym, 2012, 90(2): 1106–1113.
- [21] 吕爱军, 顾丹, 胡秀彩, 等. 斑马鱼肠道中一株酵母菌菌株的鉴定与系统发育分析[J]. 菌物学报, 2011, 30(3): 421–425.
- Lv AJ, Gu D, Hu XC, *et al.* Identification and phylogenetic analysis of a Yeast strain from the intestinal tract of zebrafish *Danio rerio* [J]. J Fungus, 2011, 30(3): 421–425.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



王 乐, 讲师, 博士, 主要研究方向为食品微生物与发酵工程。
E-mail: wanglely1984@163.com



黄继红, 教授级高级工程师, 主要研究方向为农产品发酵工程。
E-mail: Huangjihong1216@126.com