

斯达油脂酵母 U9018 产胞外多糖的适宜条件

刘月英¹ 薛雄志² 郑忠辉¹

(厦门大学生物学系¹, 环境科学研究中心², 福建厦门, 361005)

摘要 研究了斯达油脂酵母 U9018 产胞外多糖的适宜条件: 培养基组成(g/L): 蔗糖 100, 蛋白胨 7, KH_2PO_4 3.5, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 3.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, NaCl 0.01, 初始 pH 6.5. 装液量为 500ml 三角瓶装培养基 70ml, 接种量 5%。在上述条件下, 25℃ 振荡(200r/min)培养 108h, 纯多糖产量可达 23.2g/L。

关键词 斯达油脂酵母菌, 胞外多糖, 适宜条件

近年来, 随着微生物多糖研究的深入, 新的微生物多糖被不断发现, 多糖的潜在用途不断被开发。然而, 研究比较成熟, 或可工业生产, 产品可在工业上使用的微生物多糖仍为数不多^[1~3]。为了开发利用微生物多糖, 我们以能产生胞外多糖的斯达油脂酵母 2.1390 为出发菌株, 经诱变, 选育得到胞外多糖产量较高的菌株 U9018, 并对其多糖的发酵条件和理化性质^[4]进行了研究。U9018 多糖是由半乳糖、甘露糖和葡萄糖醛酸组成的一种酸性杂多糖。它具有高粘性和高凝胶性, 多糖溶液的粘度随温度的升高而不可逆增大, 多糖形成的凝胶不含色素, 透明度高, 形成凝胶时吸水膨胀率大; 与槐豆胶等半乳甘露聚糖相似^[5], U9018 多糖与黄原胶形成的混合胶溶液具有显著的增粘协效性。从 U9018 多糖的一些特性表明, 它有可能广泛应用于食品与其它工业, 并有可能扩大黄原胶的应用范围。本文报道 U9018 产生胞外多糖的适宜条件。

1 材料与方法

1.1 菌种

斯达油脂酵母菌 (*Lipomyces starkeyi*) U9018, 经诱变获得。

1.2 培养基和培养条件

斜面培养(%): 饴糖 5, 酵母膏 0.5, 琼脂 2, 28℃ 培养 48h。

种子培养(%): 饴糖 5 或蔗糖 2, 酵母膏 0.5, 250ml 三角瓶装培养液 30ml, 28℃ 振荡培养 36h。

摇瓶发酵: 培养基(g/L)参考文献[6]稍加修改, 即蔗糖 80, 蛋白胨 3, KH_2PO_4 3.5, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 3.5, 混合盐 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, NaCl 0.01); pH 6.5, 500ml 三角瓶装培养液 70ml, 接种子液 3.5ml, 旋转式摇床(200r/min) 25℃ 培养 96h。此培养基和培养条件是进行多糖发酵条件试验的基础。

1.3 测定方法

pH 的测定: 用“Orion”型数字显示 pH 计测定。

菌体生长: 以菌体干重计。

多糖的测定: 多糖分离同文献[4], 多糖测定用苯酚-硫酸法^[7]。

2 结果与讨论

2.1 碳源的影响

通常含有限制营养(常是氮源)的高碳源含量培养基有利于胞外多糖的合成, 所以在胞外多糖生产中碳源需要量较大。因而, 寻找一种廉价的碳源就显得更加重要。试验以葡萄糖、蔗糖和三种淀粉分别作为碳源进行多糖发酵。

结果(表 1)表明,以 8%蔗糖作碳源,多糖产量以及多糖对蔗糖的转化率均最高。斯达油脂酵母含有 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶^[8],U9018 能利用可溶淀粉等三种淀粉合成胞外多糖,且多糖的单糖组分与用蔗糖为碳源合成的多糖组分相同(结果从略)。以所试的三种淀粉为碳源,多糖的产量和转化率都远不如蔗糖。鉴于蔗糖来源丰富,因此,选用蔗糖作碳源还是比较符合生产要求的。

表 1 碳源对 U9018 产胞外多糖的影响

碳源	多糖产量	转化率*
(%)	(g/L)	(%)
葡萄糖 6	9.641	16.07
葡萄糖 8	13.211	16.51
蔗糖 6	10.368	17.28
蔗糖 8	14.321	17.88
可溶淀粉 6	6.632	11.05
地瓜淀粉 6	7.213	12.02
玉米淀粉 6	7.516	12.53

发酵时间:120h

* 多糖对蔗糖的收率,下同

2.2 无机盐的影响

用(1)多糖发酵基本培养基(用自来水配制);(2)除不加入混合盐溶液外其他成分同(1);(3)用蒸馏水代替自来水,其他同(2)等 3 种培养液,分别进行多糖发酵,25℃ 振荡培养 96h。结果(表 2)表明,用自来水配培养基又添加混合盐溶液的多糖产量最高。说明 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Na^{+} 、 SO_4^{2-} 以及存在于自来水中的一些离子对 U9018 多糖的合成有促进作用。这些离子可能用于底物吸收或作为辅助因子^[9]。

表 2 无机盐对多糖产量的影响

培养基	多糖产量(g/L)	转化率(%)
1	10.44	13.05
2	7.35	9.19
3	5.94	7.43

2.3 起始 pH 的影响

将培养基的 pH 调至 7.0、6.5、6.0、5.5 和

5.0 进行试验。结果(表 3)表明,产多糖的最适 pH6.5。在培养基起始 pH7.0~5.0 范围内,发酵终 pH 相差甚微(仅相差 0.05),但多糖产量则相差颇大。说明培养基的起始 pH 是影响 U9018 胞外多糖形成的关键因素之一。

表 3 起始 pH 对多糖产量的影响

起始 pH	终 pH	多糖产量 (g/L)	转化率 (%)
7.00	2.60	9.75	12.19
6.50	2.58	10.05	12.56
6.00	2.56	7.55	9.44
5.50	2.57	7.20	9.00
5.00	2.62	6.85	8.56

2.4 通气量的影响

用 500ml 三角瓶分别装入 50、70、90 和 120ml 培养基,接种子液 5%,在 25℃ 下振荡培养 96h。结果表明,装液量 70ml,多糖产量最高(14.21g/L),装液量 50、90 和 120ml,多糖产量分别为 12.68、13.42 和 12.94g/L。用上述四种不同的装液量,多糖的产量相差不大,说明该菌对氧的要求不高,这在生产上具有实际意义。

2.5 蔗糖、蛋白胨和磷酸盐浓度的影响

微生物的生长和产物的积累取决于培养基各组分的综合平衡,特别是碳源、氮源和磷酸盐浓度的适当配比。因此,在上述试验结果的基础上,采用三因素正交试验,以确定培养基中碳源(C)、氮源(N)和磷酸盐(P)的含量。

从表 4 中可见,培养基中 C、N、P 含量不同对多糖产量影响很大。从表 4 中的 r 值表明,培养基中 C、N、P 的含量对多糖产量的影响效果为 C>P>N;对多糖转化率的影响则是 P>C>N。但不管是多糖产量还是多糖转化率,都以蔗糖浓度 10%、蛋白胨浓度 0.7%、磷酸盐浓度 0.7%时最高。试验中虽然未求出 C、N、P 的上限,但从表 4 中试验 5 和 9 二个组的多糖转化率分别为 22.50%和 22.80%来看,若将蔗糖浓度提高至 10%以上,势必降低多糖的转化率;再从表 4 中试验 7 与 9 二个组的多糖

产量和多糖转化率极为相近表明,当培养基中蔗糖浓度 10% 时,蛋白胨和磷酸盐的浓度均为 0.7% 已足够。

表 4 蔗糖、蛋白胨和磷酸盐的浓度正交试验结果分析

试验	因素(%)			多糖产量 (g/L)	转化率 (%)
	蔗糖	蛋白胨	磷酸盐*		
1	6	0.3	0.3	9.40	15.67
2	6	0.5	0.5	11.60	19.33
3	6	0.7	0.7	11.80	19.67
4	8	0.3	0.5	14.40	17.75
5	8	0.5	0.7	18.00	22.50
6	8	0.7	0.3	12.00	15.00
7	10	0.3	0.7	22.40	22.40
8	10	0.5	0.3	13.60	13.60
9	10	0.7	0.5	22.80	22.80
<hr/>					
多糖产量	K ₁	32.80	46.00	35.00	
	K ₂	44.20	43.20	48.60	
	K ₃	58.80	46.60	52.20	
	k ₁	10.93	15.33	11.67	
	k ₂	14.73	14.60	16.20	
	k ₃	19.60	15.53	17.40	
	r	8.67	1.13	5.73	
<hr/>					
转	K ₁	54.67	55.82	44.27	
化	K ₂	55.25	55.43	59.88	
率	K ₃	58.80	57.47	64.57	
	k ₁	18.22	18.61	14.76	
	k ₂	18.42	18.48	19.96	
	k ₃	19.60	19.16	21.52	
	r	1.38	0.68	6.76	

* $\text{KH}_2\text{PO}_4 : \text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} = 1 : 1$, 发酵时间 120h

根据以上试验, U9018 多糖发酵的适宜培养基组成 (g/L): 蔗糖 100, 蛋白胨 7, KH_2PO_4 3.5, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 3.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, NaCl 0.01。

2.6 多糖发酵过程

用上述适宜的培养基和培养条件进行发酵, 定时取样测 pH、菌体量和多糖量。结果 (图 1) 表明, 培养基的 pH 随菌体量和多糖的增加而迅速下降, pH 降至 3.2 之后, 菌体量和 pH 均趋于稳定, 但多糖量则随菌体量的增加而提高, 发酵至 108h, 多糖产量达 23.2g/L。菌体生长是多糖合成的基础, 若在发酵的 48h 内, 控制 pH 使菌体迅速增殖, 然后由菌体生长和多糖积累引起的 pH 下降来限制菌体继续增殖, 使更多的碳源用于合成多糖, 这样有可能进一步提高多糖的产量和产率或缩短发酵时间。

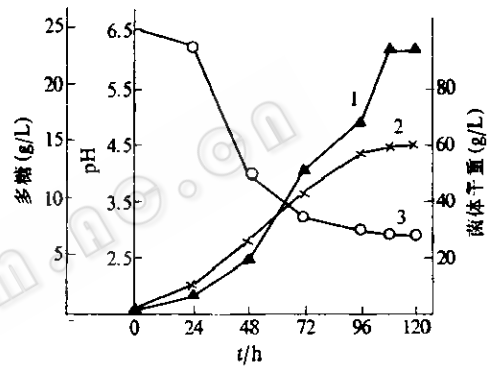


图 1 U9018 多糖发酵过程

1. 多糖, 2. 菌体, 3. pH

参 考 文 献

- [1] Paul F, Morin A, Monsan P. *Biotechnol Adv*, 1986, 4: 245~259.
- [2] 淡家林. *生物工程学报*, 1986, 2(3): 19~24.
- [3] 刘洪灿, 任永娥, 陈吉棣等. *微生物学通报*, 1993, 20(3): 147~149.
- [4] 薛雄志, 刘月英, 郑忠辉. *厦门大学学报(自然科学版)*, 1994, 33(6): 848~852.
- [5] 刁虎欣, 郑双诚. *食品与发酵工业*, 1992, 1: 69~72.
- [6] Anderson R F, Cadmus M C, Benedict R G, et al. *Arch Biochem Biophys*, 1960, 89: 289~292.
- [7] (日)微生物研究法讨论会编, *微生物学实验法*, 北京: 科学出版社, 1983, 200.
- [8] Kelly C T, Moriarty M E, Fogerty W M. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1985, 22: 352~358.
- [9] 刁虎欣, 赵大健. *微生物学杂志*, 1990, 10(1.2): 136~141.

SUITABLE CONDITIONS FOR EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCTION BY *LIPOMYCES STARKEYI* U9018

Liu Yueying¹ Xue Xiongzhi² Zheng Zhonhui¹

(Department of Biology¹, Research Center of Environment Science², Xiamen University, Fujian Xiamen 361005)

Abstract Suitable conditions have been studied for exopolysaccharide production by *Lipomyces starkeyi* U9018. Composition of the suitable medium was as following (g / L): Sucrose 100, Peptone 7, KH_2PO_4 3.5, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 3.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, NaCl 0.01. The optimal initial pH for exopoly saccharide production was pH 6.5. The optimal medium volume in 500 ml flask was 70 ml. Under these conditions, the yield of exopolysaccharide was as high as 23.2 g / L on rotary shaker at 25°C for 108 h.

Key words *Lipomyces starkeyi*, Exopolysaccharide, Suitable conditions