

# 控制 pH 环境对出芽短梗霉胞外多糖合成的影响

张汉波 程立忠 沙 涛 丁骅孙 赵之伟

(云南大学生物系 昆明 650091)

**摘要:**采用添加  $\text{CaCO}_3$  和  $\text{HCl}$  的方法研究了 pH 对出芽短梗霉多糖发酵的影响规律。在 P2 培养基中发酵 24h, 该菌有一个强烈的产酸期, 导致 pH 迅速下降到 3.6 左右。在此 pH 环境下继续发酵 120h, 多糖产量仅为 5.9g/L。如果用 MP2 培养基 (P2+0.5% $\text{CaCO}_3$ ) 发酵, 由于  $\text{CaCO}_3$  缓冲了发酵 pH 的下降, 在整个发酵过程中 pH 值可以维持在 5.0 以上, 多糖产量达到 31g/L。该菌的多糖合成不仅与发酵初始 pH 有关, 关键在于整个发酵过程中发酵 pH 值必须维持在 5.0 以上。

**关键词:**出芽短梗霉, 控制 pH, 多糖合成

**中图分类号:**Q93 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2001)01-035-04

## THE EFFECTS OF A CONTROLLED pH ENVIRONMENT ON POLYSACCHARIDE SYNTHESIS BY *AUREOBASIDIUM PULLULANS*

ZHANG Han-Bo CHENG Li-Zhong SHA Tao DING Hua-Sun ZHAO Zhi-Wei

(Department of Biology, Yunnan University, Kunming 650091)

**Abstract:** The effect of pH on the extracellular polysaccharide synthesis by *Aureobasidium pullulans* was studied by adding  $\text{CaCO}_3$  and  $\text{HCl}$ . Cultivated in P2 liquid medium for 24h, pH dropped to 3.6 because of strongly producing acid. Under this low pH environment, further fermentation for 120h, only 5.9g/L of

polysaccharide was obtained. When grown in MP2 medium containing 0.5%  $\text{CaCO}_3$ , the pH was kept above 5.0 during 144 hours, production of polysaccharide increased to 31g/L. The detailed information of effects of controlled pH on polysaccharide production showed an optimal pH value 5.0 must be maintained through the fermentative period.

**Key words:** *Aureobasidium pullulans*, Controlled pH environment, Polysaccharide synthesis

出芽短梗霉是一种细胞形态极其多样化的真菌,包括芽生孢子、菌丝、厚垣孢子和其他形态各异的中间细胞形态,这些细胞具有不同的胞外多糖合成能力<sup>[1,2]</sup>。其中,芽生孢子是合成多糖的主要细胞形式<sup>[3]</sup>。由于培养条件特别是 pH 值的变化,培养物中的细胞形态会发生转变,这种转变进一步影响了多糖的产量<sup>[4]</sup>。因此,环境 pH 值的动态变化对该菌胞外多糖的合成有极大的影响。我们采用添加  $\text{CaCO}_3$  和 HCl 的方法,对整个发酵过程中 pH 值的变化与多糖合成的关系作了详细的研究,并初步阐明了 pH 值影响该菌多糖合成的规律。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

色素变异菌株 *Aureobasidium pullulans* R45,由本实验室通过原生质体再生筛选获得,保存于 PDA 斜面培养基上<sup>[5]</sup>。

### 1.2 培养基

YEPD, PDA 培养基用常规配方; P2 培养基:  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  1g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  2g, NaCl 0.5g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05g,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.01g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01g 蔗糖 50g pH7.0 定容到 1000mL。

### 1.3 多糖发酵

取保存菌种一环,转接入 YEPD 液体培养基(18mm×180mm 试管,装液量为 5mL), 28℃, 180r/min 摇瓶活化 24h。转接 0.1mL 活化菌液于多糖发酵培养基中(50mL 三角瓶,装液量 15mL),同样的温度和转速摇瓶培养。

### 1.4 发酵 pH 及多糖测定

发酵 pH 用酸度计测定。多糖产量按下面的方法进行:取 5mL 培养物,加一倍体积的去离子水稀释,3000r/min 离心 10min,取上清液,加 1.5 倍体积的 95% 乙醇沉淀多糖,如果多糖沉淀物结块好,可直接用镊子挑取,否则,可用上述条件离心收集多糖。将获得的多糖在 80℃ 条件下烘烤至恒重,电子天平称量。多糖转化率(%)为: 
$$\frac{\text{发酵液多糖产量(g/L)}}{\text{培养基蔗糖含量(g/L)}} \times 100\%$$

## 2 结果

### 2.1 不同时间添加 $\text{CaCO}_3$ 对发酵 pH 和多糖产量的影响

为深入了解 R45 菌株在 P2 培养基中的多糖发酵规律及添加  $\text{CaCO}_3$  对发酵 pH、多糖合成的影响<sup>[6]</sup>,我们设计了两组平行实验,结果见表 1、表 2。

表 1 是第 1 组实验共 9 个实验号的结果。在摇瓶过程中,于不同的时间各取出一个实验号,测定发酵液 pH 值,然后加入  $\text{CaCO}_3$  添加量为 0.075g,以终浓度 0.5% 计算),充分摇匀后,静置 10min,再测定发酵液 pH 值和多糖产量,停止摇瓶。同时取出第 2 组中的一个对应实验号,无菌操作加入 0.075g  $\text{CaCO}_3$  后,继续摇瓶,到发酵终点(144h)统一测定它们的多糖产量和 pH 值(表 2)。

结果显示,在 P2 培养基中,发酵初期 pH 值下降很迅速,摇瓶培养到 24h pH 值已降到 3.6,以后 pH 值下降缓慢,发酵终点降到 2.8。发酵 24h 开始有少量多糖产生,随后在 pH 值低于 3.6 的条件下,菌体虽然仍可合成多糖,但能力很弱,到 144h,多糖产量为 5.92g/L,转化率为 11.8%(见表 1)。

表 1 在 P2 培养基中发酵 pH 和多糖产量的动态变化以及添加 CaCO<sub>3</sub> 后发酵液 pH 的回调情况

实验号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
时间(h)	0	12	24	36	48	72	96	120	144
添加 CaCO <sub>3</sub> 前的 pH 值	6.8 *	6.6	3.6	3.5	3.4	3.4	3.2	2.8	2.8
添加 CaCO <sub>3</sub> 后的 pH 值	7.1	6.8	5.5	5.5	5.5	5.5	5.4	5.3	5.0
多糖产量(g/L)	0.0	0.0	1.1	1.4	1.8	2.6	3.0	4.5	5.9
转化率(%)	0.0	0.0	2.2	2.8	3.6	5.2	6.0	9.0	11.8

\* 配制时 pH 为 7.0,高压灭菌后有所降低

表 2 不同时间添加 CaCO<sub>3</sub> 对终点发酵 pH 和多糖较量的影响

实验号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
添加 CaCO <sub>3</sub> 时间(h)	0	12	24	36	48	72	96	120	144
发酵 144h 后的多糖产量(g/L)	26.2	25.2	26.0	21.0	15.4	10.0	5.6	5.2	4.8
转化率(%)	52.4	50.4	52.0	42.0	30.8	20.0	11.2	10.4	9.6
终点 pH	5.4	5.4	5.4	5.3	5.3	5.3	5.3	5.2	5.0

表 2 中各实验号的 pH 值动态变化及添加 CaCO<sub>3</sub> 后发酵 pH 值的回升情况可通过表 1 的对应实验号来确定。在发酵 24h 即 pH 值降到 3.6 以前添加 CaCO<sub>3</sub>,继续发酵到 144h 的多糖产量均有显著提高,达 26g/L 左右。(见表 2 的前 3 个实验号)发酵 24h 后(此时的发酵 pH 值已降至 3.6)添加 CaCO<sub>3</sub>,虽然 CaCO<sub>3</sub> 的添加可以将发酵的 pH 值回升到 5.0 以上,但随 CaCO<sub>3</sub> 添加时间的延迟,多糖产量逐渐降低。发酵 96h 后才添加 CaCO<sub>3</sub>(表 2 后 3 个实验号),此时 pH 值的回升基本上已无助于多糖的合成,多糖产量与未添加 CaCO<sub>3</sub> 的实验号(表 1 的第 9 个实验号)一样。

两组实验的结果表明两点:①、在 P2 培养基中,出芽短梗霉多糖发酵 pH 值随发酵时间的延长而降低,发酵前 24h 是产酸高峰期。②、该菌合成多糖需要维持一个较为合适的 pH 值环境。实验结果表明,发酵 pH 控制在 5.0~5.5 之间的实验号比不控制的对应号要好得多。菌体处在较低的 pH 环境下的时间越长,多糖合成能力越弱。

## 2.2 不同时间添加 HCl 对多糖发酵的影响

另两组平行实验(每组 9 个实验号)采用 MP2 培养基(P2+0.5%CaCO<sub>3</sub>),装液量仍然是 15mL。第 3 组实验于接种后开始摇瓶,每隔一定时间取出一个实验号,测定发酵 pH 值,然后添加 0.1mol/L HCl 将 pH 调至 3.5,记录下添加的 HCl 量。静置 10min 后测多糖产量,停止摇瓶(表 3)。同时,取出第 4 组的一个对应实验号,无菌操作加入此 HCl 用量,充分摇匀后,继续摇瓶到发酵终点(144h)测多糖产量和 pH 值(表 4)。

在 MP2 培养基中由于有 CaCO<sub>3</sub> 来缓冲发酵 pH 值的下降,如果不添加 HCl 进行人为的 pH 值调整,在 144h 的发酵期内 pH 能保持在 5.0 以上。在这种 pH 环境下,发酵 24h 后多糖合成快速增加,144h 产量可达 31g/L(表 3 第 9 个实验号)。如果在发酵初期(24h 前)就通过添加 HCl 将发酵 pH 下调到 3.5,发酵终点几乎没有多糖的合成。但在 pH 值 5.0 以上发酵 96h 后,即使 pH 值被人

为降到 3.5,对多糖的合成已无明显影响(表 4)。

表 3 在 MP2 培养基中发酵 pH 和多糖产量的动态变化以及将 pH 降低到 3.5 所消耗的 HCl 的量

实验号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
时间(h)	0	12	24	36	48	72	96	120	144
添加 HCl 前的 pH 值	7.0	6.8	5.6	5.4	5.3	5.2	5.2	5.2	5.1
添加 HCl 的数量(mL)	1.5	1.5	1.5	1.4	1.4	1.0	1.0	1.0	1.0
多糖产量(g/L)	0.0	0.0	2.8	7.4	10.2	21.2	24.6	30.8	31.0
转化率(%)	0.0	0.0	5.6	14.8	20.4	42.4	49.2	61.6	62

表 4 不同时间添加 HCl 对终点发酵 pH 和多糖产量的影响

实验号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
添加 HCl 的时间(h)	0	12	24	36	48	72	96	120	144
发酵 144h 后的多糖产量(g/L)	微量	微量	3.3	8.8	13.4	22.8	26.8	28.8	27.4
转化率(%)	—	—	6.6	17.6	26.8	45.6	53.6	57.6	54.8
终点 pH	3.0	3.0	3.3	3.3	3.5	3.5	3.0	3.5	3.5

总的结果显示,出芽短梗霉在发酵前期(24h),细胞的生长伴随着强烈的产酸,使得发酵 pH 值很快下降,阻碍了多糖的合成。如果发酵 pH 值能够维持在 5.0 以上,此后到发酵 96h 这个时间段,菌体将开始大量合成多糖。

### 3 讨论

初始 pH 值对出芽短梗霉的多糖发酵有很大的影响,一般认为较好的初始 pH 值是 6.0<sup>[7]</sup>。我们认为,一个合适的初始 pH 值当然很重要,因为这不仅影响到发酵初期菌体的生长状况,也会影响到后期发酵过程中 pH 值的动态变化和菌体的多糖合成的能力,但并不是一个合适的初始 pH 值就会有好的多糖产量。菌体生长导致 pH 值不断下降,而多糖的合成又需要一个相对稳定的 pH 值(5.0)。因此,在整个发酵过程中维持这个合适的 pH 值不变才是关键。其他的多糖发酵也可能存在这种规律。

### 参 考 文 献

- [1] Catley B J. *J Gen Microbiol*, 1980, **120**:265~268.
- [2] Dominguea J B, Goni F M, Urnuburu F. *J Gen Microbiol*, 1978, **108**:111~117.
- [3] Pollock T J, Thorne L, Amentrout R W. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**:877~883.
- [4] Heald P J, Kristiansen B. *Biotechnol Bioeng*, 1985, **27**:1516~1519.
- [5] 丁骅孙, 张汉波, 程立志, 等. 云南大学学报, 1997, **19**:519~525
- [6] 张汉波, 丁骅孙, 程立志, 等. 生物技术, 1999, **9**(5):18~22.
- [7] Simon L, Caye-Vaugien C, Bouchonneau M. *J Gen Microbiol*, 1993, **139**:979~985.