

卜多糖发酵条件试验

徐纯锡 王世卓 徐冠珠 谈家林

(中国科学院微生物研究所,北京)

卜多糖(Pullulan)也称短梗霉多糖。我们从11株产卜多糖的出芽短梗霉中选出3.2756号菌株*,经亚硝基胍处理,得到变异株N28,并对其产卜多糖的发酵条件进行试验,现报道如下。

材料和方法

一、菌株

出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*)的变异株N28号菌株。

二、培养基和培养方法

菌株保存用马铃薯和麦芽汁斜面培养基。发酵基础培养基(g/L): $(NH_4)_2SO_4$ 0.6, KH_2PO_4 2.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, NaCl 1.0, 酵母膏 2.5, 蔗糖 50; pH 6.0, 250ml 三角瓶装培养基 50ml, 接入培养2日的种子液 0.5ml。培养温度 29—30℃, 摇床转速为 220rpm。

三、测定方法

1. 菌体生长: 以菌体干重量计。发酵液以蒸馏水稀释3倍,离心除去上清液,菌体沉淀用水洗2次,105℃烤干,称至恒重。

2. 粗卜多糖: 取去菌体的上清液 1ml, 加 1.5ml 95% 的乙醇,充分摇动静置后离心,去上

清液,沉淀用 1ml 水溶解,再次加乙醇沉淀卜多糖,离心后取干物用水溶解,并稀释至适当浓度后。用蒽酮法测定。

3. 残糖: 上清液直接用蒽酮法测定总糖量,减去粗卜多糖量,作为残糖量。

4. 粘度: 用 Ostward 法。

四、结构鉴定

发酵上清液用二乙氨基纤维素(DEAE)处理脱色后,用乙醇沉淀。沉淀物晾干后配成1%溶液。取20ml溶液,加比重1.125的HCl 2ml,在100℃水浴中迴流2小时,使多糖完全水解。水解液经中和后透析一日,用纸层析法鉴定酸水解产物。展开剂为吡啶:丁醇:水=4:6:3(V/V),显色剂为苯胺-二苯胺。另取多糖液2ml,加0.2M磷酸盐缓冲液(pH5.6)2ml和0.1%卜多糖酶0.2—0.3ml,45℃酶解1或5小时,鉴定其酶解产物。

五、材料

卜多糖样品和纯卜多糖酶(又称支链淀粉酶)为日本林原生化研究所产品。麦芽三糖为东京化成工业株式会社产品。粗卜多糖酶为轻工业部食品发酵研究所产品。其他试剂和仪器

* 其中8株由本所菌种保藏室提供,3株由李明霞同志赠送。

均为国产。

结果和讨论

1. 不同起始 pH 对产卜多糖的影响: 结果见表 1。

表 1 不同起始 pH 对产卜多糖的影响(发酵 5 天)

结果 起始 pH	项目		
	发酵终 pH	卜多糖 (mg/ml)	转化率 (%)
5.0	2.5	3.5	7.0
5.5	3.0	12.0	24.0
6.0	3.5	14.5	29.0
6.5	3.8	13.3	26.6
7.2	5.9	8.5	17.0

表 1 说明起始 pH 为 5.5—6.5、发酵终 pH 3.0—3.8, 对卜多糖的产生有利。起始 pH 为 6.0 时, 卜多糖产量最高, pH 5.5 以下或 6.5 以上时卜多糖产量显著降低。

2. 蔗糖浓度与产卜多糖的关系: 在基础培养基中加入不同量的蔗糖, 发酵 5 天后测定, 结果见表 2。

表 2 蔗糖浓度与产卜多糖的关系

结果 蔗糖浓度(%)	项目				
	发酵 终 pH	卜多 糖 (mg/ ml)	转化 率 (%)	残糖 (mg/ ml)	残糖 率 (%)
1	3.5	1.5	15.0	0.3	3.2
3	3.5	10.0	33.3	7.1	23.4
5	3.5	19.3	38.6	9.0	18.0
10	3.5	25.2	25.3	27.5	27.5
15	3.5	32.0	21.0	73.0	48.7
20	3.5	28.7	14.4	110.5	55.3
25	3.5	25.0	10.0	162.5	65.0
30	3.5	20.0	6.7	233.8	77.9
35	3.5	20.5	5.9	268.8	76.8

结果说明, 蔗糖浓度在 15% 以下时, 卜多糖的单位产量随糖浓度的增加而升高, 而 15% 以上时, 则情况相反。蔗糖浓度为 5% 时, 转化率最高。残糖和残糖率随蔗糖浓度的增加而上升。

3. 氮源的影响: 结果见表 3。

表 3 不同氮源和浓度对产卜多糖的影响

结果 氮源名称	项目			
	氮源 浓度 (%)	发酵 终 pH	卜多糖 (mg/ ml)	转化 率 (%)
硫酸铵	0.03	5.0	13.3	26.6
	0.06	3.5	11.7	23.4
	0.10	3.2	12.3	24.7
	0.30	2.0	2.5	5.0
蛋白胨	0.03	5.0	9.7	19.3
	0.06	5.0	9.3	18.7
	0.10	5.4	10.0	20.0
	0.30	6.0	13.0	26.0
硫酸铵+酵母膏	0.05+ 0.05	4.7	10.3	20.6
无氮源	0	5.8	8.0	15.7

结果表明, 硫酸铵浓度在 0.1% 以下, 卜多糖产率差别不大。氮源浓度为 0.3% 时, 卜多糖产量极少, 此条件下发酵终 pH 为 2.0, 说明过低 pH 不利于产生卜多糖。而过低的 pH 与过量的硫酸铵有关。但用蛋白胨作氮源则与硫酸铵不同, 一定范围内用量越多卜多糖产量越高, 而发酵中 pH 不下降。试验结果说明, 高浓度的蛋白胨与低浓度的硫酸铵产卜多糖量近似, 这与结绿^[1]的报道相似。不加氮源, 仅靠培养基中酵母膏和接种时带进的有限的含氮化合物, 卜多糖的产量也能达到一定量。Catly 等^[4]的研究指出, 卜多糖的形成开始于氮源接近零的浓度, 因为 NH_4^+ 延长生长而抑制多糖的形成。我们的试验结果与 Catly 的报道一致。

4. 生长发酵刺激素的影响: 结果见表 4。

表 4 刺激素对卜多糖产量的影响

结果 刺激素名称	项目			
	刺激素 用量 (%)	发酵终 pH	菌体量 (mg/ ml)	卜多糖 (mg/ ml)
酵母膏	0.25	3.0	5.8	8.6
玉米浆	2.0	6.5	4.5	8.3
硫酸素	0.04	3.0	2.6	2.9
生物素	0.0002	3.0	2.0	2.6
硫酸素+生物素	0.04+ 0.0002	3.0	2.2	2.6
无刺激素	0	3.0	2.3	2.6

结果说明, 单独或同时加入硫酸素和生物素, 都不能满足生长和发酵的需要。使用酵母膏或玉米浆可提供多种维生素, 效果较好。酵母膏浓度与产卜多糖关系见表 5。

表 5 酵母膏浓度对产卜多糖的影响

结果 酵母膏浓度(%)	项目		
	发酵终 pH	卜多糖 (mg/ml)	转化率 (%)
0	3.0	5.1	10.2
0.05	3.0	5.1	10.2
0.10	3.0	6.0	12.0
0.20	3.0	10.2	20.4
0.25	3.5	12.4	24.8
0.30	3.5	11.5	23.0
0.40	3.5	12.2	24.4
0.50	3.5	12.5	25.0

表 5 说明, 酵母膏的用量在 0.25% 以上有利于卜多糖的产生。用蛋白陈作氮源或用玉米浆作生长刺激素发酵, 其终 pH 在 6.0 以上, 与 Ono^[2] 报道的保持 pH6.0 不使其下降, 则产卜多糖量低不同。这个现象未见报道。

5. 无机盐的影响: 结果见表 6。

表 6 无机盐与产卜多糖的关系

结果 无机盐名称	项目				
	无机盐浓度 (%)	发酵终 pH	卜多糖 (mg/ml)	转化率 (%)	发酵液相对粘度
KH ₂ PO ₄	0.1	3.0	8.0	16.0	2.6
	0.2	3.5	12.5	25.0	5.0
	0.3	3.5	12.6	25.2	5.8
	0.4	4.0	12.0	24.0	7.9
	0.5	5.0	13.1	26.2	8.8
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0	3.1	4.6	9.2	
	0.01	3.1	9.3	18.6	
	0.02	3.1	8.7	17.4	
	0.04	3.1	8.8	17.6	
	0.05	3.1	8.9	17.8	
NaCl	0	3.5	12.1	24.2	
	0.05	3.0	13.3	26.6	
	0.10	3.0	13.3	26.6	
	0.10	3.0	13.3	26.6	
	0.20	3.0	12.7	25.4	

表 6 说明, 0.2% KH₂PO₄, 0.01% MgSO₄ · 7H₂O, 0.05% NaCl 已满足发酵需要, 在此浓

度以上, 效果未见增加。另外 KH₂PO₄ 的浓度不同, 虽然对卜多糖产量无明显影响, 但发酵液的粘度随其浓度提高而增加, pH 的缓冲作用也逐渐增强。

6. 摇瓶装液量对卜多糖产量的影响: 结果见表 7。

表 7 摇瓶 (500ml) 装液量对卜多糖产量的影响

结果 装液量 (ml)	项目		
	发酵终 pH	菌体量 (mg/ml)	卜多糖 (mg/ml)
50	3.5	4.85	8.4
75	3.5	4.20	11.0
100	3.5	4.85	10.5
150	3.5	4.80	8.0

结果说明菌体生长与装液量关系不大, 卜多糖产量以装液量 75 和 100ml 时最高。由于卜多糖的粘稠性质, 摇瓶与直接通气的效果是否一致, 有待放大试验证明。

根据上述结果, 适于产卜多糖的发酵培养基成份为 (g/L): 蔗糖 50, 硫酸铵 0.3, 酵母膏 2.5, KH₂PO₄ 2.0, MgSO₄ · 7H₂O 0.1, NaCl 1.0; pH6.0。这与文献报道相近^[1,2]。

7. 发酵过程: 3000ml 三角瓶装 500 毫升发酵液, 接入种子液 5ml。摇动发酵培养, 每天取

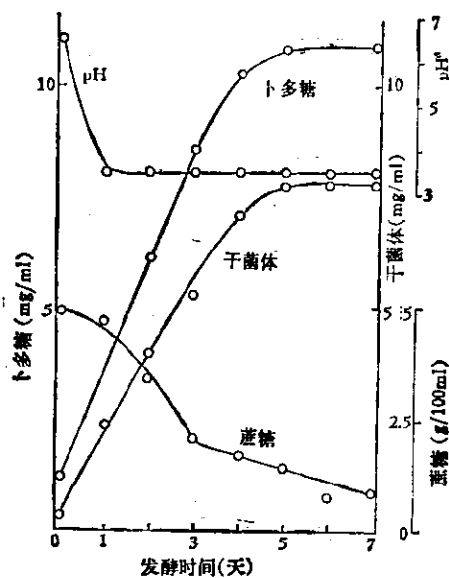


图 1 发酵过程

样测定。发酵过程见图1。

结果表明,发酵1日, pH降至3.0, 以后基本不变。发酵1—3日菌体生长和产卜多糖量



图2 酶水解卜多糖产物纸层析图谱*

* 图中左起1,2用精制酶水解;3,4用粗酶水解;5为麦芽三糖;6为麦芽糖;7为葡萄糖;酶水解时间5小时,温度45℃。

均呈对数增加,第5日达到高峰。

8. 产物鉴定: 将提取的卜多糖样品进行酸水解和酶水解, 酸水解后的纸层析结果表明: 酸水解后只有葡萄糖生成, 未见其他单糖组分, 证明产物完全由葡萄糖组成。用粗制及精制卜多糖酶水解后层析图谱见图2。

酶水解结果表明, 只有麦芽三糖产生, 证明产物确是由麦芽三糖单位经 α -1, 6-位碳原子连接而成。而粉末状卜多糖水解液和絮状卜多糖水解液(酸水解), 其水解产物中只含葡萄糖。上述结果是在摇瓶水平上进行的, 尚需经放大试验, 取得进一步结果。

参 考 文 献

- [1] Catly, B. J.: *Appl. Microbiol.*, **22**: 641—645, 1971.
- [2] Ono, K. N. Yasuda and S. Ueda: *Agri. Biol. Chem.*, **41**: 2113—2118, 1977.
- [3] 结缘谏吉: 日化协月报: 253—259, 1976.
- [4] Catly, B. J.: In "Microbial polysaccharides and polysaccharases, Barkeley G. W. et al. (ed)." Pub. Soc. For general Microbiology Acad. Press, London, 1979, 69—84.
- [5] 杉本要: 発酵と工業, **36**: 98—108, 1978.