

几株出芽短梗霉在不同发酵条件下产生多糖的比较

任永娥 江 宁 谢浩旭 周铁锁 孙万儒

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 将已有的 4 株出芽短梗霉在摇瓶中于不同发酵条件下进行比较, 考察了它们的生长情况, 不同的碳源、氮源、磷酸盐、初始 pH 和通气量等对短梗霉多糖合成的影响, 获得一株产短梗霉多糖的高产菌株, 为以后工作打下良好基础。

关键词 出芽短梗霉, 短梗霉多糖, 发酵

短梗霉多糖是一种应用面极广的新型生物高分子材料, 受到普遍重视^[1,2]。用于发酵生产短梗霉多糖的菌种出芽短梗霉 (*Aureobasidium pullulans*) 比较容易获得, 但其生理生化特性差异较大, 生产短梗霉多糖的能力也不同, 而这种差异因发酵条件不同又有变化^[3,6]。本文报道在不同发酵条件下进行比较, 以获得高产菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 出芽短梗霉 (*Aureobasidium pullulans*) 1.9, 和 12 为谈家林先生筛选得到, 325 和 336 由毛维颖先生提供。

1.1.2 培养基组成(%): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.06, K_2HPO_4 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, NaCl 0.1, 淀粉水解物 10, pH6.0, 250ml 三角瓶装 40ml, 于 112℃ 湿热灭菌 30min。

1.1.3 种子培养基组成(%): 除了淀粉水解物改用 5% 蔗糖外, 其他同基础培养基组成。

1.1.4 斜面培养基: 土豆-麦芽汁培养基。

1.1.5 试剂: 萘酚、葡萄糖以及其他试剂均为

市售分析纯试剂, 右旋糖苷为 Pharmacia 产品。

1.2 方法

1.2.1 斜面种子培养: 用接种针从原斜面上取 1 环细胞接种在斜面上, 于 28℃ 下培养 5d。

1.2.2 摇瓶培养: 在 25ml 的斜面种子培养试管中加入 10ml 无菌水, 使细胞悬浮, 每个摇瓶中加入 1.0ml 菌悬液, 于 28℃ 下, 在旋转摇床上 200r/min 培养 5d。

1.2.3 生物量测定: 定量取发酵液, 加入蒸馏水稀释 5 倍, 4000r/min 下离心 30min, 倾出上清液用于糖测定。沉淀的菌体用蒸馏水洗涤离心 2 次, 于 100℃ 下干燥至恒重, 用称重法测定生物量。

1.2.4 总糖测定: 发酵液的离心上清液进行适当稀释, 用萘酚法测定。用无水葡萄糖制作标准曲线^[7]。

1.2.5 短梗霉多糖测定: 取一定量发酵液的离心上清液, 加入 5 倍乙醇进行多糖沉淀, 离心后将沉淀溶解, 稀释一定倍数后用萘酚法测定,

1994-06-13 收稿

以右旋糖苷为标准样品制作标准曲线^[7]。

1.2.6 发酵液粘度测定：用 Brookfield 粘度计 (LVT) 的 1 或 2 号转头测定。

2 结果与讨论

2.1 生长比较

将菌种 12, 1.9, 325 和 336 的斜面加入无菌水, 制成菌悬液, 稀释到一定浓度, 在土豆-麦芽汁平板上涂布接种, 28℃ 培养, 观察各菌生长情况。结果表明 (表 1), 菌种 325 和 336 号生长快, 类酵母细胞比例高; 而 12 和 1.9 号菌种生长较缓慢, 且菌丝体比例高, 而类酵母细胞比例低。一般来说类酵母细胞比例高的菌种生产短梗霉多糖的能力较强。

表 1 各菌生长情况

菌种号	12	1.9	325	336
生长	中	慢	快	快
菌落	中	小	较大	较大
颜色	黑褐	棕	黑	黑
细胞形态	菌丝体多	菌丝体多	类酵母细胞多	类酵母细胞多

2.2 在同一种培养基和条件下的比较

在基础培养基上, 分别接种 12, 1.9, 325 和 336 四个菌进行发酵, 在 96h 和 144h 后分别测定多糖转化率。表 2 的结果说明在发酵的前 96h, 12 号菌种的转化率在四种所试菌种中最高, 但发酵到 144h, 转化率最高的菌种为 325。菌种 1.9 转化能力最低。

表 2 不同发酵时间对转化率的影响

时间 (h) \ 转化率 (%)	菌种号			
	12	1.9	325	336
96	26.25	8.98	25.28	24.45
144	48.96	24.51	52.11	45.72

2.3 不同碳源的影响

为找到能利用淀粉产多糖的菌种, 利用各种淀粉作碳源对四个菌种进行比较。食用和工业淀粉均经酸水解后加入培养基, 结果列于表 3。

表 3 在不同碳源上的比较

碳源	菌种 12			菌种 325		
	终 pH	粘度 (Pa. s)	转化率 (%)	终 pH	粘度 (Pa. s)	转化率 (%)
食用淀粉	2.5	0.822	29.79	2.5	1019	45.55
工业淀粉	2.5	0.820	14.05	2.5	987	30.29
可溶性淀粉	4.0	0.647	31.04	4.1	756	30.60
葡萄糖	4.0	0.529	28.68	4.2	680	39.01

以上结果说明菌种 325 号的发酵液不论多糖转化率还是粘度均高于菌种 12 号。四种碳源相比, 食用淀粉要比其他淀粉和葡萄糖的效果好。

经上述条件下的比较发现, 在四株菌中, 12 和 325 号菌的转化能力较高。因此, 在基础培养基上对这两株菌进行比较, 改变基础培养基中的氮源, 对发酵转化率的影响如表 4。

2.4 不同氮源比较

表 4 不同氮源对转化率的影响

菌种号 \ 转化率 (%)	氮 源				
	(NH ₄) ₂ SO ₄	NH ₄ Cl	尿素	(NH ₄) ₂ CO ₃	NaNO ₃
12	25.30	33.08	25.68	30.31	18.08
325	39.09	39.90	19.62	35.12	15.14

氮源浓度: 0.06%, 发酵时间: 108h

结果表明,在各种铵盐为氮源的培养基上,325号菌株的转化能力高于12号菌株,而在尿素和硝基氮培养基上,325号菌的转化能力低于12号菌,说明325号菌利用非氨态氮不如12号菌。从发酵液的pH变化上发现,不论在任何氮源上12号菌的pH均低于325号菌,以硝酸盐为氮源时,发酵液的pH基本无大变化,而铵盐为氮源时,pH均降到3.2—4.1,尿素对pH的降低作用也不如铵盐,但高于硝酸盐。

2.5 不同起始pH的影响

在完全相同的条件下,比较不同起始pH对两个菌株发酵的影响。图1结果表明,两个菌株的最适的发酵起始pH基本相同,为pH6.5左右。

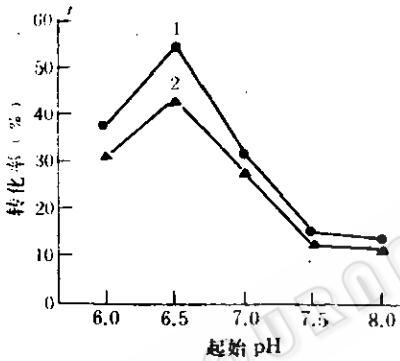


图1 培养基起始pH对12和325号菌株发酵的影响
1. No. 325, 2. No. 12

2.6 摇瓶培养时培养基装量对转化率影响

在500ml三角瓶内装入不同量的培养基,

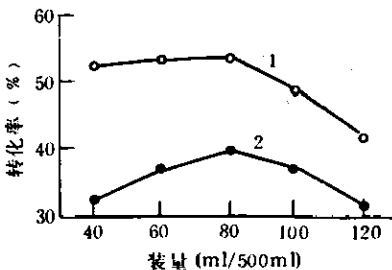


图2 培养基的装量对两个菌种发酵转化率的影响
1. No. 325, 2. No. 12

接种后于相同条件下发酵,测定转化率。325号菌比12号菌在发酵时需氧略高些,在较高通气

条件下,325号菌转化率较高。在80ml/500ml以下装量影响不十分明显,而12号菌在较高的通气条件下,其转化率略有下降。在高于100ml/500ml装量时,转化率开始下降(图2)。

以上比较说明325号菌合成短梗霉多糖的能力高于12号菌,且两菌在生理上略有差别。325号菌生长较快,酵母状细胞比例也高于12号菌。因此,以下发酵条件研究均用325号菌。

2.7 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 用量的影响

在保持培养基中的其他成分不变的条件下,在培养基中加入不同浓度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,考察多糖转化率。

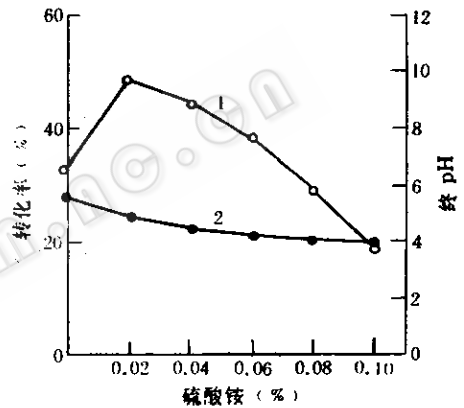


图3 培养基中硫酸铵含量对多糖转化率的影响
1. 转化率, 2. pH

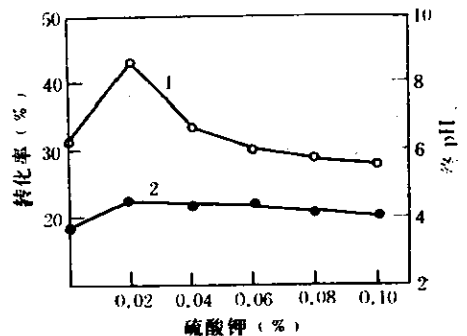


图4 K_2SO_4 用量对转化率的影响
1. 转化率, 2. pH

结果表明(图3), 0.02%的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 对提高转化率是有利的, 但用量增加时转化率反而下降, 而发酵终了pH随 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 用量增

加而下降,但当浓度超过 0.04% 时,终了 pH 随 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度增加而降低,但不明显。

2.8 K_2SO_4 对转化率的影响

在基础培养基中加入不同量的 K_2SO_4 , 其用量对转化率的影响如图 4。

发酵培养基中含有 0.02% 的 K_2SO_4 可以提高多糖转化率,而高于 0.04% 时,对多糖转化率影响较小。

2.9 磷酸盐的影响

在发酵基础培养基内加入不同量的磷酸盐,接种后进行发酵。从表 5 的结果可以看出,

表 5 磷酸盐对多糖发酵的影响

磷酸盐浓度 (%)	终 pH	发酵液颜色	粘度 (Pa. s)	转化率 (%)
1.0	4.0	棕黑	0.846	43.56
0.8	4.0	棕黑	0.892	39.54
0.6	4.4	棕黑	0.947	35.82
0.4	4.4	棕黑	0.981	25.65
0.2	4.8	棕黑	1.158	19.77

随着培养基中的磷酸盐浓度增加发酵液的终了 pH 略有增加,转化率明显增加,而发酵液的粘度降低。说明磷酸盐有提高转化率,降低产物短梗霉多糖分子量作用,这与文献报道^[8]是一

致的。因此可以通过控制培养基中的磷酸盐的量控制产物短梗霉多糖分子量,但若通过提高磷酸盐浓度的办法提高发酵转化率是有限的,需要用其他办法解决。

致谢 徐纯锡同志参加部分技术工作,在此表示衷心感谢。

参 考 文 献

- [1] Yuen S. Process Biochemistry, 1974, 7-10.
- [2] Sutherland I W. Biotechnology of Microbiology Exopolysaccharides. Cambridge University Prece. Cambridge, 1990.
- [3] Denis R. Ashok M. John H Y L. Appl Microb Biochechn, 1988, 28: 361-366.
- [4] Carine L. Laroit A, LeDuy G N. Biotechnol Bioengin, 1985, 27: 202-207.
- [5] McNeuk B, Kristiansen B, Seviour R J et al. Biotechn Bioengin, 1989, 33: 1210-1212.
- [6] Marc A. Bulmer B J C, Patrik J K. Appl Microb Biotechn, 1987, 25: 362-365.
- [7] 张杰杰. 复合多糖生化研究技术. 北京: 科学出版社. 1988, 1-9.
- [8] Kato K, Makato S. United States Patent, 3 912 591 1975.

THE COMPARISON OF VARIOUS STRAINS OF *AUREOBASIDIUM PULLULANS* PRODUCING PULLULAN AT DIFFERENT CONDITIONS

Ren Yonge Jiang Ning Xie Haoxu Zhou Tiesuo Sun Wanru

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract The comparison of four strains of *Aureobasidium pullulans* producing pullulan were carried out at different fermentation conditions in the shaking flask. It found that their growth is not same at the same culture condition and production of pullulan was affected by carbon and nitrogen source, phosphate, initial pH and loading amount in the shaking flask. A strain *Aureobasidium pullulans* No. 325 has the highest productivity of pullulan was obtained.

Key words *Aureobasidium pullulans*, Pullulan, Fermentation