

出芽短梗霉发酵生产卜多糖的研究

(I)不产黑色素酵母样形态菌株的选育*

陈 世 年

(华侨大学化工与生化工程系, 泉州 362011)

摘要 研究用溴乙锭和紫外线为诱变剂,筛选出不产黑色素并具有酵母样细胞形态的卜多糖生产菌种出芽短梗霉 SN08.

关键词 溴乙锭,紫外线,黑色素,卜多糖,酵母样细胞

分类号 TQ 929.2

卜多糖(Pullulan)也称短梗霉多糖,是具有酵母样和菌丝型形态,属半知菌类的双型性真菌出芽短梗霉的胞外代谢物.研究表明,卜多糖是一种以麦芽三糖为基本单位的由 α -1,6糖苷键连结的链状水溶性中性多糖.近十年来,已先后发现卜多糖可用作血浆代用品、食品增稠剂、食品包装膜、化妆品和肥料等,在工、农、医等领域具有广泛的用途^[1].因此,卜多糖的生产与研究业已引起许多投资商和科学家的重视.卜多糖在生产过程中需解决如下两个难题:一是培养物在发酵48 h后开始分泌大量的黑色素,使产品在下游加工中必须采用活性炭多次脱色;二是作为双型性真菌的出芽短梗霉在发酵过程中只有当形态呈酵母样时,才能分泌出大量的卜多糖.这两个障碍的实质可归因于生产菌种的遗传特性和发酵参数的控制.针对这两个问题,本研究采用溴乙锭结合紫外线对出发菌株出芽短梗霉 AS3.3984 进行诱变处理,得到不产生黑色素的具有酵母样形态的卜多糖生产菌株 SN08.

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 出发菌种 出芽短梗霉 AS3.3984 系中国科学院微生物研究所菌种室保存菌种.

1.1.2 试剂 所用试剂均为市售分析纯和生化试剂级.

1.1.3 斜面和平板培养基 PDA 培养基.

1.1.4 发酵培养基的质量分数($\times 10^{-2}$) 蔗糖 5.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.03, 酵母膏 0.25, KH_2PO_4 0.20, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, NaCl 0.10, pH 值按研究方案定, 121 °C 灭菌 30 min.

1.2 实验方法

1.2.1 培养条件 采用二级摇瓶培养, 500 mL 三角瓶定容 100 mL 发酵培养基接入斜面菌

* 本文 1994-10-14 收到;国家教委资助课题

种后,培养物置于 $220\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 旋转式摇床 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养时间(t)为 48 h . 种子液按其质量分数 0.1 接至装量为 150 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中同一温度与转速连续培养 144 h .

1.2.2 诱变剂及诱变处理 用质量分数为 0.002 KCl 生理盐水把出发菌种斜面培养物制成每 mL 孢子数量为 3×10^6 的孢子悬液,再用质量分数为 0.002 KCl 稀释成每 mL 3×10^2 个孢子后取 3 mL 置于电磁搅拌器上搅拌照射. 紫外灯(功率为 30 W)照射距离 25 cm ,时间 30 s ,在暗室红光下进行. 取处理后的孢子悬液 0.1 mL 涂布在 PDA 固体培养基上培养 48 h ,存活率为 52% . 挑选颜色略带浅粉红色的菌落移接至 PDA 斜面上培养 48 h 供溴乙锭诱变处理.

1.2.3 EB 诱变处理 取上述斜面培养物用质量分数为 0.002 KCl 制成孢子数量为 3×10^6 的孢子悬液. 溴乙锭用体积分数为 0.25 乙醇配成 $10:1$ 溶液. 取孢子悬液 3 mL ,溴乙锭溶液 $90\text{ }\mu\text{L}$ 置于试管内室温下摇床振荡 3 h 后,再用质量分数为 0.002 KCl 稀释 $1\text{ }000$ 倍后,取 0.1 mL 涂布于 PDA 固体培养基上培养 48 h . 挑选颜色为粉红色的小菌移至 PDA 斜面上培养 48 h 供进一步试验.

1.2.4 卜多糖的提取按文[3]进行.

1.2.5 卜多糖分子量按文[4]测定重均分子量(\overline{MW}). 仪器为美国 Chromatix 公司 KMX-6 折光指数增量仪和 KMK-16 小角激光散射仪,工作温度 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$,溶剂为无离子水.

1.2.6 形态观察采用日本 Olympus 公司 BHA 光学显微镜按文[5]进行.

1.2.7 细胞生物量用菌体干重表示, $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘干称至恒重.

2 结果和讨论

2.1 出发菌种和突变体在固体培养基上的培养特征

出芽短梗霉(AS 3.3984)和突变体(SN08)在 PDA 固体培养基上的培养特征见表 1.

表 1 出芽短梗霉 AS3.3984 和突变体 SN08 两菌株培养特征的比较

t/h	菌落质地		颜 色		菌落大小/mm	
	AS 3.3984	SN 08	AS 3.3984	SN 08	AS 3.3984	SN 08
24	表面光滑,粘稠	表面光滑,粘稠	白 色	白 色	12~15	12~10
48	表面光滑,粘稠,边缘有黑灰色绒毛状菌丝,菌落呈扇形	表面光滑,粘稠,边缘有米色绒毛状菌丝	暗灰色	白色略微有粉红色	20~30	10~15
72	表面隆起,边缘有暗橄榄绿色绒毛状菌丝,菌落呈扇形	表面平滑,粘稠 有光泽,边缘有米色和白色绒毛状菌丝	黑 色	浅粉红色	30~45	15~20
96	表面隆起,皱褶,边缘干燥有黑色绒毛状菌丝	表面平滑,较干燥,边缘有浅黄色绒毛状菌丝	黑 色	粉红色	50~70	20~30
120	表面干燥,皱褶,边缘有黑色绒毛状菌丝	表面平,干燥,边缘有暗黄色绒毛状菌丝	黑 色	橙红色	75~85	30~35

从表 1 可以发现,发现出发菌种出芽短梗霉 AS 3. 3984 在固体培养基上生长 48 h 后菌落边缘开始出现黑色绒毛状菌丝,摇瓶培养也在同一时间培养液变成黑色. 而 SN08 无论在固体培养上或摇瓶培养中都未见有黑色素出现. SN08 在摇瓶培养过程中,发酵液由米色在 48 h 后逐步转为浅粉红色,96 h 至 120 h 由粉红色转变为橙红色. 与 AS 3. 3984 相比,突变体 SN08 的菌落明显小于出发菌种 AS 3. 3984.

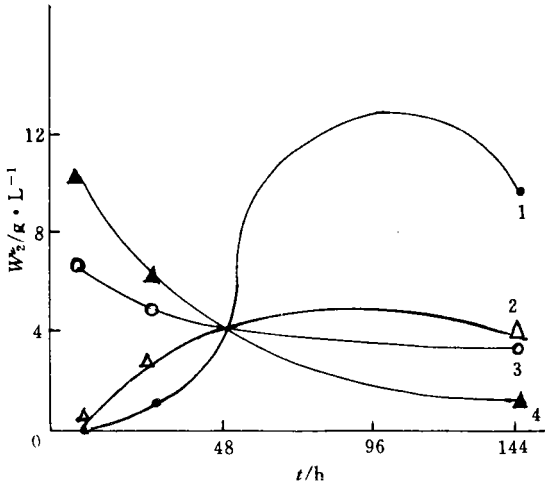
2.2 突变体 SN08 的摇瓶培养

附图是突变体 SN08 在发酵培养基起始 pH6. 0,培养时间为 144 h 的动态变化过程. 从附图可以看出,SN08 的生长速率在 48 h 开始进入对数生长期,72 h 培养物的生长速率达到最大值,72~96 h 是生长平衡期,此后生长速率开始趋于下降. 显微镜观察发现 SN08 在发酵培养基起始 pH 值为 6. 0 时,细胞形态呈酵母样. 卜多糖大量生成出现在 48 h,但是生成速率的最大值出现在 96 h,120 h 后略有下降. 卜多糖是出芽短梗霉的胞外代谢物. 然而实验表明,卜多糖的生成速率与出芽短梗霉培养过程中生长速率不一致,根据 Kazuhisa Ono 等人的研究^[5],这一现象可归因于环境因素也控制着卜多糖的生成,最主要因素是发酵培养基不同的起始 pH 值. 发酵培养基不同的起始 pH 值表明(见表 2),pH 为 2. 5~4. 5 时,SN08 的细胞生

表 2 不同起始 pH 值对 SN08 卜多糖生成量 W_1 及细胞量 W_2 的影响^①

起始 pH 值	$W_1/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$W_2/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
2.5	4.0	6.2
3.0	4.2	6.1
3.5	5.1	6.1
4.0	6.6	5.7
4.5	6.7	5.7
5.0	10.6	4.3
5.5	11.9	4.1
6.0	13.7	3.5
6.5	13.0	3.5
7.0	12.5	3.7

①培养时间为 144 h



附图 SN08 摇瓶培养的动态变化过程
1. 卜多糖; 2. 微生物生长速率;
3. pH 值; 4. 糖耗

物量高但卜多糖生成量低,其中以 pH2. 5 最具代表性. 当起始 pH 为 6. 0 时,卜多糖的生成量最高而细胞生物最低. 显微镜观察发现,起始 pH 为 2. 5 时 SN08 细胞呈菌丝形态;而 pH 为 6. 0 时则细胞形态为酵母样. 同样的结果也在出发菌株 AS3. 3984 的摇瓶培养中观察到.

由此看来,出芽短梗霉形态的双型性以及卜多糖的生成不仅受遗传机制,而且受 pH 值的控制.

综合上述研究结果可知,不产黑色素的出芽短梗霉 SN08 可以作为生产菌株. 其发酵时

间以 120 h 为宜,此时所提取的卜多糖为白色, \overline{MW} 测定结果为 2.5×10^5 .

参 考 文 献

- 1 Yuen S. Pullulan and its application. *Process Biochem*, 1974,22:7~9
- 2 Thomas J P , Linda T, Richard W A. Isolation of new aureobasidium strains that produce high molecular-weight pullulan with reduced pigmentation. *Appl. Environ. Microbiol*, 1992,58:877~883
- 3 Kato K, Shiosaka M. Process for the production of pullulan. U. S. Patent, 3912591. 1975
- 4 Muzzarelli R A A, Catherine L, Monica E. The molecular weight of chitosans studied by laser light scattering. *Carbohydr. Res.*, 1987,164:433~442
- 5 中国科学院微生物研究所编. 菌种保藏手册. 北京:科学出版社,1980. 773~782
- 6 Ono K, Yasuda N, Ueda S. Effect of pH on pullulan elaboration by aureobasidium pullulans S-I. *Agric. Biol. Chem.*, 1977,41(11):213~218

Producing Pullulan by Aureobasidium Pullulans Fermentation

(I) Selective Breeding of a Strain Bearing Yeast-like Cells and Generating No Melanin Chen Shinian

(Dept. of Chem. & Biochem. Eng., Huaqiao Univ., Quanzhou, 362011)

Abstract With ethidium bromide and ultraviolet light as mutagen, SN08 as a strain bearing yeast-like cells and generating no melanin can be screened for the production of pullulan.

Keywords ethidium bromide, ultraviolet light, melanin, pullulan, yeast-like cells