

一株粘性多糖产生菌LV-1的发酵条件研究

梁玉丽, 郭继强, 陈晓艺, 刘志文, 李宪臻* (大连工业大学生物与食品工程系, 辽宁大连116034)

摘要 [目的] 研究从土壤中分离到的粘多糖产生菌LV-1的发酵条件。[方法] 以梯度稀释法筛选粘多糖产生菌, 探讨碳源、氮源、初始pH值和温度对粘多糖生产的影响, 确定最佳发酵条件。[结果] 对LV-1菌株粘性多糖产物的理化性质分析发现, 该多糖易溶于水, 难溶于乙醇、正丁醇、氯仿等有机溶剂, 为中性多糖, pH值7.5, 带负电荷, 不含蛋白质、果糖基、糖醛酸基和硫酸根, 无还原末端, 不具有淀粉样结构。LV-1菌株的最佳发酵条件为: 3%甘露醇为碳源, 0.25%酵母粉为氮源, 培养基初始pH值7.0, 培养温度28℃。[结论] 该研究可为LV-1菌的开发利用及粘性多糖的工业化生产提供依据。

关键词 微生物多糖; 发酵条件; 分离

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)09-03953-03

Research on the Fermentation Conditions of a Viscous Polysaccharide-producing Bacterium LV-1

LIANG Yu-li et al (Department of Biology & Food Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning 116034)

Abstract [Objective] The fermentation conditions of a viscous polysaccharide-producing bacterium LV-1 which isolated from soil sample were studied. [Method] The polysaccharide-producing bacterium was isolated by serial dilution method, the effects of carbon source, nitrogen source, the initial pH and temperature on producing polysaccharide by it were discussed to confirm the optimum fermentation conditions. [Result] The physicochemical properties showed that the polysaccharide was water-soluble, but insoluble in organic solvents including ethanol, butanol, and chloroform. It was neutral polysaccharide with negative charge and without reducing terminal. The pH of its solution was pH 7.5. There were no protein, fructose, uronic acid, sulphate and starch-like structure included in polysaccharide molecules. The optimum fermentation conditions for polysaccharide production were 3% mannitol as carbon source, 0.25% yeast extract as nitrogen source, culture temperature 28℃ and pH 7.5. [Conclusion] The research could provide basis for development and utilization of LV-1 and industrialized production of viscous polysaccharide.

Key words Microbial polysaccharides; Fermentation conditions; Isolation

研究发现, 某些多糖具有增强免疫、增加巨噬细胞数量和抗肿瘤等生物活性^[1-2]。多糖生物资源的研究和开发利用日益活跃, 已成为天然药物、生物化学、生命科学的研究热点^[3]。微生物多糖是由细菌、真菌、蓝藻等产生的一类对微生物具有保护作用的糖聚合物。与植物多糖相比, 微生物多糖具有安全无毒、理化性质独特、生产周期短等优势, 有较强的市场竞争力和广阔的发展前景^[4]。目前微生物多糖已被广泛用作胶凝剂、成膜剂、保鲜剂、乳化剂等。能够产生微生物胞外多糖的微生物种类较多, 但是真正有应用价值并已工业化生产的仅有10余种。近几年, 随着对微生物多糖研究的深入, 微生物多糖的产量和年增长量均在10%以上, 而一些新兴多糖年增长量在30%以上。到目前为止, 已大量投产的微生物胞外多糖有黄原胶、小核菌葡聚糖、短梗霉多糖、热凝多糖等^[5]。笔者在研究微生物多糖的生产过程中, 从土壤中分离到一株能够分泌粘性多糖的微生物, 故对该粘性多糖生产菌的分离筛选和发酵条件进行研究, 为该菌的开发利用和粘性多糖的工业化生产提供依据。

1 材料与方 法

1.1 粘性多糖产生菌的分离与培养

1.1.1 菌株分离。将2g土样加入100ml含有3g异麦芽酮糖和0.15g酵母浸粉的培养基中, 28℃摇床(150r/min)培养2d, 然后将菌悬液用生理盐水梯度稀释法涂平板, 于28℃培养箱内培养过夜。用牙签挑取单菌落分别接种于标记好的固体培养基和液体培养基中, 并分别在28℃的培养箱和摇床(150r/min)内培养, 观察液体培养基中的菌体生长情况,

选择粘度明显增加的菌株, 分别接种到新鲜的液体培养基内, 28℃、150r/min摇床内培养72h, 测定上清液的粘度, 选择粘度最大的菌株为目的菌。为保证分离菌的纯度, 采用平板划线法进一步纯化, 并将获得的单菌落编号为LV-1。

1.1.2 菌株培养。从菌体生长良好的培养皿中接种1环LV-1菌到种子培养基中, 于28℃、150r/min摇床中培养8~10h, 使OD₆₀₀达到0.8~1.0后, 按5%接种量将菌悬液接种于液体培养基, 在28℃、150r/min的摇床中培养。种子培养基(100ml)组成为异麦芽酮糖3g, 酵母浸粉0.15g, 4种盐溶液(5%磷酸氢二钾溶液, 8%氯化钠溶液, 2.5%硫酸镁溶液, 7%硝酸钾溶液, 下同)各1ml; 液体培养基(100ml)组成为异麦芽酮糖3g, 酵母浸粉0.15g, 4种盐溶液各0.5ml。

1.2 培养环境对粘性多糖生产的影响

1.2.1 碳源。将液体培养基中的异麦芽酮糖分别用葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、淀粉、甘露醇和木糖替换, 接种LV-1菌后, 于28℃、150r/min条件下进行摇床培养, 培养36h后取样测定发酵液中的菌体浓度, 继续培养36h后取样测定发酵上清液的粘度和糖浓度。

将液体培养基中的碳源浓度分别调整为2%、3%、4%、5%、6%和7%, 以5%的接种量接入LV-1菌后, 在28℃、150r/min条件下进行摇床培养, 培养36h后取样测定发酵液中的菌体浓度, 继续培养36h后取样测定发酵上清液的粘度和糖浓度。

1.2.2 氮源。按5%接种量将LV-1菌接种至分别含有0.15%酵母粉、蛋白胨、胰蛋白胨、牛肉膏、酪蛋白水解物和硫酸铵的液体培养基中, 在28℃、150r/min条件下摇床培养, 36h后取样测定发酵液的菌体浓度, 继续培养36h后测定发酵上清液的粘度和多糖含量。

分别配制含有0.05%、0.10%、0.15%、0.20%、0.25%和0.30%酵母粉的液体培养基, 并按5%接种量接种LV-1菌后, 在28℃、150r/min条件下摇床培养, 36h后取样测定发酵

基金项目 国家自然科学基金项目(30670067)。

作者简介 梁玉丽(1972-), 女, 内蒙古包头人, 硕士研究生, 研究方向: 生物工程。* 通讯作者, 教授, E-mail: xianzhen@dlpu.edu.cn。

收稿日期 2008-12-24

液的菌体浓度,继续培养36 h后测定发酵上清液粘度和多糖含量。

1.2.3 培养基起始pH值和培养温度。将液体培养基的初始pH值用2 ml/L 盐酸或氢氧化钠分别调整为5.0、6.0、7.0、8.0、9.0和10.0,按5%接种量接入LV-1菌,在28、150 r/min条件下进行摇床培养,36 h后取样测定发酵液的菌体浓度,继续培养36 h后测定发酵上清液粘度和多糖含量。

按5%接种量将LV-1菌接入液体培养基中,分别在23、28、30、35及40和150 r/min条件下摇床培养,36 h后取样测定发酵液的菌体浓度,继续培养36 h后测定发酵上清液粘度和多糖含量。

1.3 多糖溶液的制备 取10 ml 发酵液,8 000 r/min离心30 min后,取上清液加入40 ml 95%乙醇,室温下放置4 h,8 000 r/min离心,沉淀用95%乙醇洗3次后,溶解于10 ml 去离子水中,得多糖溶液。

1.4 化学分析 粘度按毛细管自然沉降法测定^[6],以时间 η 为粘度计量单位。菌体浓度采用1 cm比色皿在600 nm处测定发酵液的OD值。总糖浓度采用酚-硫酸法测定^[7];粘多糖的带电性采用阴/阳离子树脂吸附法检测;果糖采用间苯二酚分光光度法检测^[8],其中473 nm处吸光度小于0.1为阴性;还原末端采用3,5-二硝基水杨酸法检测^[9];糖醛酸采用硫酸-吡啶法测定^[10],其中530 nm处吸光度小于0.1为阴性。茚三酮反应、 SO_4^{2-} 检测反应、蒽酮检测反应和碘-碘化钾反应按文献[11]中的方法进行。

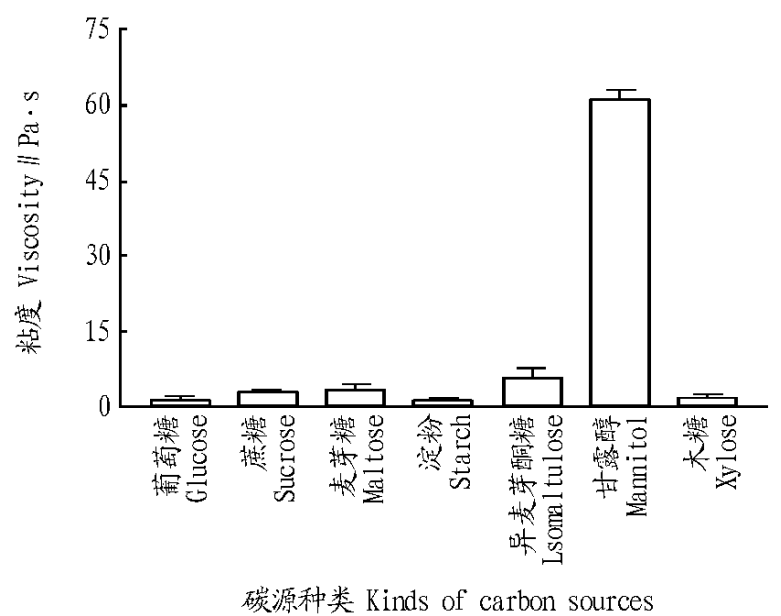
2 结果与分析

2.1 菌种分离及粘多糖产物的理化性质 将梯度稀释法获得的单菌落接种于液体培养基中培养后,发现有36个菌落能够使发酵液粘度增加,重新转接到新鲜培养基中培养,并比较发酵液粘度,选取发酵液粘度最大的菌株为粘多糖生产菌,并编号为LV-1菌。

采用乙醇沉淀法从发酵液中提取微生物粘性产物,试验证明,该产物与蒽酮反应呈蓝绿色,与苯酚-硫酸反应呈黄褐色,与茚三酮反应呈阴性,初步推测该产品是多糖物质。果糖检测反应呈阴性,说明多糖中不含有果糖;DNS法检测还原糖呈阴性,说明多糖中不含有还原末端;碘-碘化钾反应呈阴性,说明多糖中不含有淀粉;硫酸-吡啶法检测糖醛酸呈阴性,说明多糖中没有糖醛酸; SO_4^{2-} 检测反应呈阴性,说明多糖不是硫酸性多糖,不含有硫酸根。该多糖产物为无味的黄白色粉末,易溶于水,有粘性,但难溶于乙醇、乙醚、丙酮、甲醇、正丁醇、氯仿等有机溶剂。多糖溶液的pH值为7.5,离子树脂吸附法确定该粘多糖产物带负电荷。

2.2 碳源对粘多糖生产的影响 由图1可知,当以甘露醇为碳源时,LV-1菌的生长大幅增加发酵液粘度,其他所测试碳源虽然能够支持菌体生长,但未能使发酵液粘度有明显变化。结果说明,LV-1菌只有在甘露醇存在的条件下才产生较高含量的粘多糖,推测甘露醇诱导LV-1菌的生产和分泌。图2表明,LV-1菌粘多糖的生产与甘露醇的添加量有关,甘露醇浓度为3%时粘多糖含量和发酵液粘度最大。

2.3 氮源对粘多糖生产的影响 图3表明,有机氮源均可促进LV-1菌粘多糖的生产,且酵母粉为氮源时,LV-1菌能够



碳源种类 Kinds of carbon sources

图1 不同碳源对发酵液粘度的影响

Fig.1 Effects of carbonsources on the viscosity of fermentation liquid

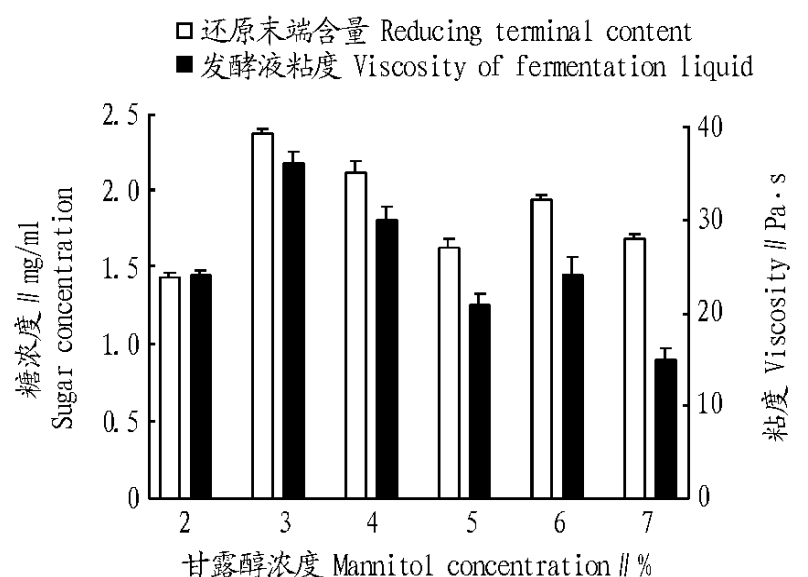


图2 甘露醇浓度对发酵液粘度及还原末端含量的影响

Fig.2 Effects of mannitol concentration on the viscosity and reducing terminal content of fermentation liquid

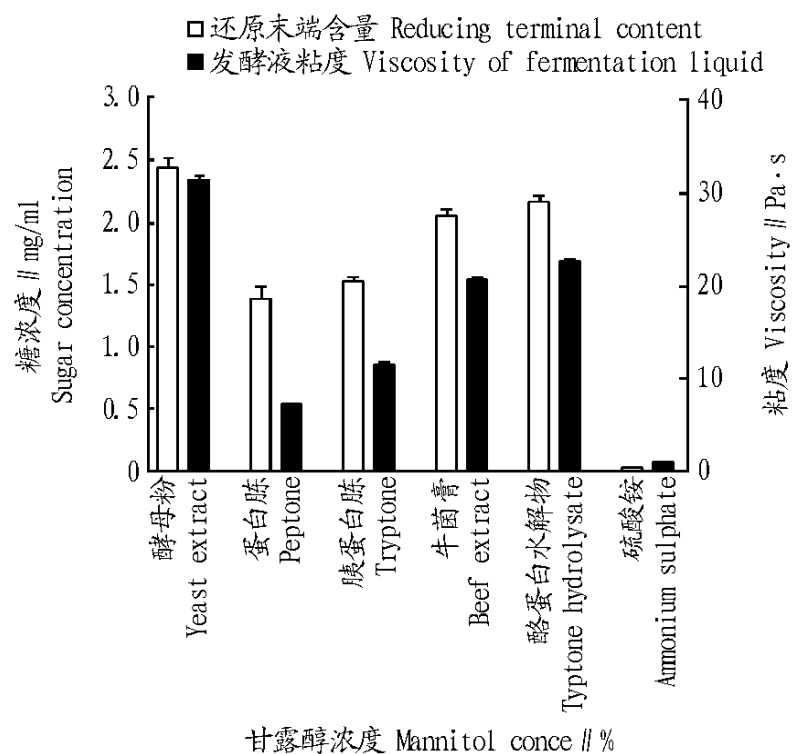


图3 不同氮源对发酵液粘度及还原末端含量的影响

Fig.3 Effects of nitrogen sources on the viscosity and reducing terminal content of fermentation liquid

产生最大浓度的粘多糖;无机氮源硫酸铵完全不能合成粘多糖。粘多糖的生产和氮源添加剂量具有相关性(图4),当酵母粉的添加量为0.25%时,发酵液中的粘多糖含量及粘度最大。

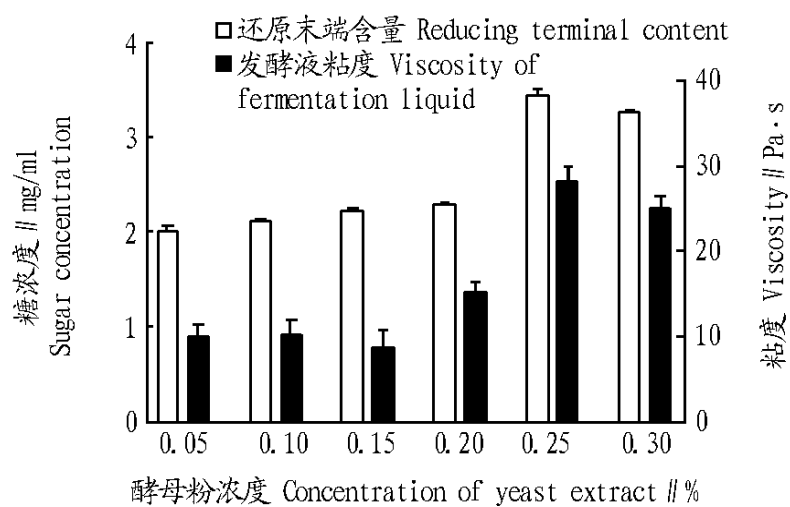


图4 酵母粉浓度对发酵液粘度及还原末端含量的影响

Fig.4 Effects of yeast extract concentration on the viscosity and reducing terminal content of fermentation liquid

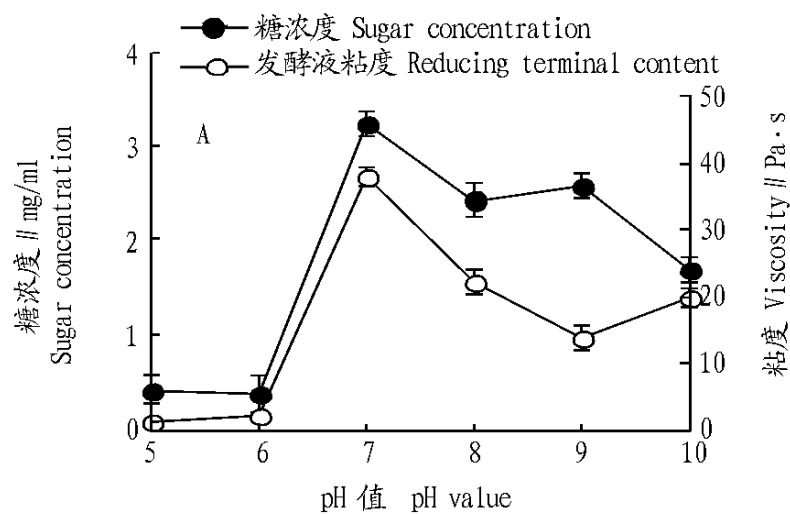


图5 培养基初始pH值(A)和培养温度(B)对发酵液粘度的影响

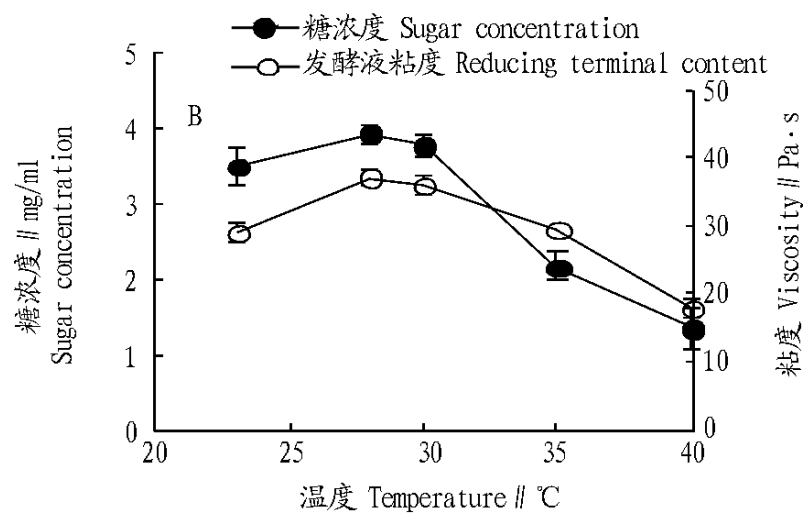
Fig.5 Effects of initial pH (A) and culture temperature (B) on the viscosity of fermentation liquid

2.4 培养温度和初始pH值对粘多糖生产的影响 由图5A可知, LV-1菌粘多糖的生产与培养基初始pH值有关, pH值5.0~7.0时, 发酵液的粘度和糖浓度都呈上升趋势; pH值7.0时, 粘多糖产量和粘度达到最大; 然后其粘度和糖浓度值开始下降。pH值为5.0~10.0时, 总体呈先升后降的过程。

将LV-1菌分别于不同温度条件下培养, 观测粘多糖的生产。由图5B可以看出, 在23~35℃时LV-1菌生长正常, 且随着温度上升, 菌体的粘多糖产量上升; 当温度为28℃时LV-1菌的粘多糖含量最高; 之后随温度上升, 粘多糖含量下降, 至40℃时菌体几乎不生长。

3 结论

该试验从土壤中分离到一株多糖产生菌LV-1, 通过对粘性多糖产物的理化性质分析发现, 该多糖易溶于水, 难溶于



乙醇、正丁醇、氯仿等有机溶剂, 为中性多糖, pH值7.5, 带负电荷, 不含蛋白质、果糖基、糖醛酸基和硫酸根, 无还原末端, 不具有淀粉样结构。对该菌株进行培养条件考察发现, 以3%甘露醇为碳源, 0.25%酵母粉为氮源, 培养基初始pH值7.0, 培养温度28℃时, LV-1菌株粘多糖的产量最高。

参考文献

- [1] SUZUKI S, HATSUKAWA H. Biological activities of polysaccharides. V. Antitumor activity of polysaccharides [J]. *Cann*, 1969, 60(1): 65-69.
- [2] FACHER J, ABEL G, JUSUPOVA A, et al. Perturbation of non-specific host defense by polysaccharides like lentinan: possible mechanisms [J]. *Int J Immunotherapy*, 1989, 5(4): 167-176.
- [3] NAKAO Y, KONNO A, TAGUCHI T, et al. Gerdan: properties and application to foods [J]. *Food Sci*, 1991, 56(3): 769-776.

- [4] FRANZ G. Polysaccharides in pharmacy: current applications and future concepts [J]. *Hart Medcal*, 1989, 55: 493-497.
- [5] 崔艳红, 黄现青. 微生物胞外多糖研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2006(2): 25-29.
- [6] AND, ZHANG G, WU H, et al. Production and partial properties of alginate from newly isolated *Havobacterium* sp. LXA [J]. *Proc Biochem*, 2008, 43: 842-847.
- [7] DOUBIS M, GILLES K, HAMILTON J K, et al. Glucuronic method for determination of sugars and substance [J]. *Anal Chem*, 1956, 28: 350-356.
- [8] 肖世远. 间苯二酚光度法测定蔗糖的适宜条件 [J]. *四川师范学院学报*, 1998, 19(3): 293-295.
- [9] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar [J]. *Anal Chem*, 1959, 31: 426-428.
- [10] 林颖, 黄琳娟, 田庚元. 一种改良的糖醛酸含量测定方法 [J]. *中草药*, 1999, 30(11): 817-819.
- [11] CHAPLIN M F, KENNEDY J F. Carbohydrate analysis: a practical approach [M]. 2nd. Oxford: Oxford University Press, 1994: 125-139.

(上接第3938页)

程曲线。图中描述了菌体量、多糖产量、残糖消耗和发酵过程pH值随发酵进程时间的变化情况。从图7可以看出, 菌体开始生长速度较慢, 24h后加快, 36h进入指数生长阶段, 到72h菌体生长进入到稳定期。与之相对应, 底物糖消耗在72h内下降很快, 到72h时糖消耗降到4.2%, pH值从初始的6.8降低至3.5。胞外多糖合成随菌体生长不断上升, 到96h时多糖产量达到最高, 为19.4g/L。

3 结论

蛹虫草胞外多糖优化发酵培养基为: 蔗糖2.00%, 蛋白

胨1.50%, KH_2PO_4 0.05%, 酵母粉0.20%, 硫酸镁0.01%; 适宜培养条件为: pH值6.8, 温度28℃。

参考文献

- [1] 褚以文. 国外医药: 抗生素分册 [M]. 北京: 中国医药出版社, 1999: 58-61.
- [2] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术 [M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1994: 11-12, 110-112.
- [3] 高惠璇. SAS/STAT 软件使用手册 [M]. 北京: 中国统计出版社, 1997: 18-22.
- [4] 吴有炜. 试验设计与数据处理 [M]. 苏州: 苏州大学出版社, 2002: 30-35.