

微生物多糖 PS202 发酵工艺条件的研究

于亚静¹, 朱萍¹, 周延华², 杨辉¹, 周河治¹

(1.广西大学生命科学与技术学院食品与发酵工程研究所, 广西 南宁 530004)

(2.南宁帕莱特生物工程有限公司, 广西 南宁 530004)

摘要: 本文研究了产胞外多糖的 PS202 菌株的发酵条件, 通过单因素试验及正交试验, 得到 PS202 菌株产胞外多糖的最佳工艺条件是: 蔗糖 5%, 牛肉膏 0.2%, 生长因子 1.2%。pH 7.2~7.5, 转速 200 r/min, 培养温度 30 °C, 培养时间 96 h。胞外多糖产量高达 3.14%。

关键词: 胞外多糖; 正交试验

中图分类号: TQ929[·]2; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)04-0014-03

Study on Fermentation of Polysaccharides PS202

YU Ya-jing¹, ZHU Ping¹, ZHOU Yan-hua², YANG Hui¹, ZHOU He-zhi¹

(1.Institute of Food and Fermentation Engineering, College of Life Science and Technology, GuangXi University, Nanning 530004 China)(2.Nanning Bright Biology Engineering Company, Nanning 530004, China)

Abstract: The fermentation conditions of Exopolysaccharides (EPSs) PS202 were determined by single-factor test and orthogonal test. From the results, the optimal sucrose content, beef extract content, the growth factor, pH value, shaking rate, temperature and extraction time for the fermentation were 5%, 0.2%, 1.2%, 7.2~7.5, 30 °C, 200 r/min and 96 h, respectively. Under those conditions, the yield of EPSs was 3.14%.

Key words: Exopolysaccharides; orthogonal test

微生物多糖是细菌、真菌、蓝藻等微生物在代谢过程中产生的具有多种生物活性的生物高聚物^[1]。微生物发酵生产多糖周期短, 不受气候和地理环境条件的限制, 可以在人工控制条件下利用各种废渣、废液进行生产^[2]。由于微生物多糖潜在用途不断被开发, 其应用的前景比动植物多糖更为广阔^[3]。所以近20年来, 多糖类化合物的研究已经广泛的引起了人们的重视^[4]。本文对产微生物多糖PS202菌株的发酵条件进行研究, 得出其优化培养基。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 出发菌株: PS202菌株由广西大学食品与发酵工程研究所提供。

1.1.2 培养基

(1) 斜面培养基(%) : 酵母浸膏0.3; 蛋白胨0.5; NaCl 0.5; 琼脂2; pH 7.2~7.5。

(2) 种子培养基(%) : 蔗糖 1.0; 酵母膏 0.3; 蛋白胨 0.5; pH7.2~7.5。

(3) 发酵培养基 I (%) : 牛肉膏 0.15, MgSO₄·7H₂O 0.05, KH₂PO₄ 0.15, FeSO₄·7H₂O 0.5,

收稿日期: 2006-10-25

生长因子 0.5, CaCO₃ 0.3, pH 7.2~7.5。

发酵培养基 II (%) : 蔗糖 4.0, MgSO₄·7H₂O 0.05, KH₂PO₄ 0.15, FeSO₄·7H₂O 0.5, 生长因子 0.5, CaCO₃ 0.3, pH 7.2~7.5。

发酵培养基 III (%) : 蔗糖 4.0, 牛肉膏 0.15, MgSO₄·7H₂O 0.05, KH₂PO₄ 0.15, FeSO₄·7H₂O 0.5, CaCO₃ 0.3, pH 7.2~7.5。

以上培养基为常规灭菌。

1.1.3 主要仪器

HYG-2 型回转式恒温调速摇床柜: 上海新星自动化设备厂; J2-21 冷冻离心机: Beckman 公司; W-CJ-IF 超净工作台: 苏净集团安泰公司; DZF-6090 真空干燥箱: 上海精宏实验设备有限公司; YQGO2 型电热式蒸汽消毒器: 山东新华医疗器械厂; 三角瓶摇瓶 (500 mL): 江阴市西石桥玻仪厂特制; 溶剂过滤器 (1000 mL): 天津市腾达过滤器厂。

1.2 方法

1.2.1 液种子培养

取一环活化好的斜面种子, 接入装有100 mL种子培养基的500 mL三角瓶中, 于30 °C, 200 r/min, 摇床培养14~16 h。

1.2.2 摇瓶发酵培养

将一级种子按 8% 的接种量接入装有发酵培养基的摇瓶中, 于 30 ℃, 200 r/min 摇床培养 96 h。

1.2.3 发酵过程中可溶性多糖及菌体含量的测定

多糖发酵液加三倍水稀释, 于 9000 r/min 离心 40 min, 上清液用无水乙醇沉淀 3 次, 将多糖沉淀置于真空干燥箱中干燥至恒重, 称重得到粗糖重量。离心后的沉淀物用纯水洗涤 3 次后用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 烘干至恒重后称重得到菌体干重。

2 试验结果与讨论

2.1 单因素试验

2.1.1 碳源对菌体生长及胞外多糖的影响

在发酵培养基 I 的基础上分别以可溶性淀粉、葡萄糖、乳糖、甘油、蔗糖以及麦芽糖为碳源 (均按 4% 的含量), 进行不同碳源的发酵试验。发酵条件为 30 ℃, 200 r/min。培养 96 h 后测定多糖产量和菌体含量。

在不同碳源发酵试验可以确定蔗糖可作为最佳碳源。不同蔗糖浓度对菌体生长及胞外多糖产量的影响试验结果如图 1 所示。

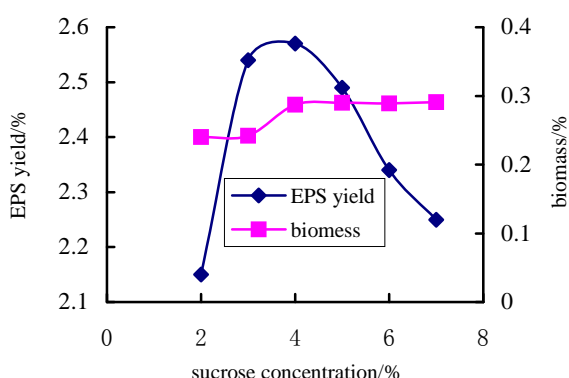


图1 蔗糖浓度对菌体生长及胞外多糖的影响

Fig.1 Effect of sucrose concentration on the PS202 fermentation

图1可看出, 随着蔗糖浓度增加, 菌体干重也随之增加, 但增加幅度趋缓。胞外多糖产量则呈先升后降的规律, 在蔗糖浓度为4%时达到最大值; 当进一步提高蔗糖浓度时胞外多糖产量下降明显, 这表明过高蔗糖浓度不利于胞外多糖的分泌。

2.1.2 氮源浓度对菌体生长及胞外多糖的影响

在发酵培养基 II 的基础上分别以 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、 NH_4NO_3 、 $\text{CO}(\text{NH}_4)_2$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KNO_3 、蛋白胨、酵母膏、牛肉膏为氮源 (均按总氮量 0.15% 计), 进行不同氮源的试验。发酵条件为 30 ℃, 200 r/min。培养 96 h 后测定多糖产量和菌体含量。

在不同氮源发酵试验可以确定牛肉膏可作为最佳氮源。不同浓度的牛肉膏对菌体生长及胞外多糖产量的影响试验结果如图 2 所示。

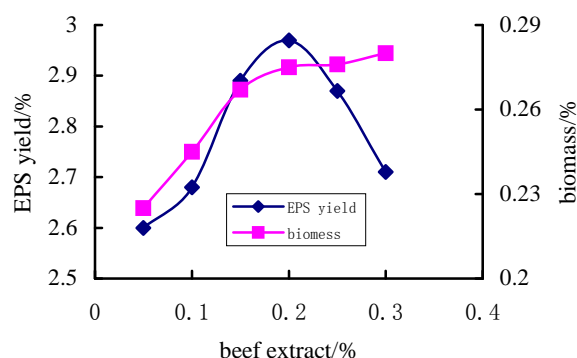


图2 牛肉膏浓度对菌体生长及胞外多糖的影响

Fig.2 Effect of taurine concentration on the PS202 fermentation

由图2可见, 随着牛肉膏浓度的增加, 菌体生长旺盛, 菌体干重增加明显, 当牛肉膏浓度为0.2%时, 菌体干重可达最高值0.275%, 此时胞外多糖的产量达到最大值2.97%; 如进一步提高牛肉膏浓度, 菌体干重增加缓慢, 但胞外多糖的产量明显下降, 这表明过高的牛肉膏浓度不利于胞外多糖的生产。

2.1.3 生长因子添加量对菌体生长及胞外多糖的影响

生长因子中维生素虽不被用作能源或细胞结构物质的来源, 但作为辅酶和辅酶组分, 它们具有重要的催化功能。因此在发酵培养基 III 中分别添加不同浓度的生长因子, 发酵条件为 30 ℃, 200 r/min。培养 96 h 后测定多糖产量和菌体含量, 考察生长因子对 PS202 发酵的影响。不同浓度的生长因子对菌体生长及胞外多糖产量的影响试验结果如图 3 所示。

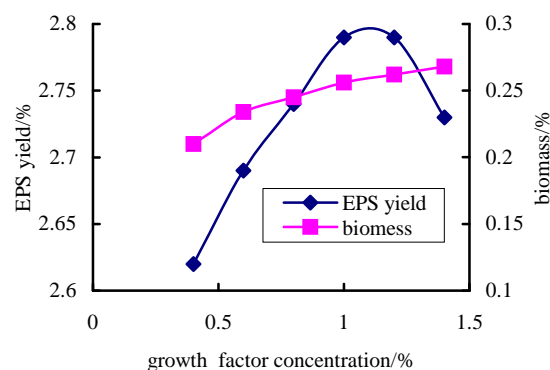


图3 生长因子对菌体生长及胞外多糖的影响

Fig.3 Effect of growth factor concentration on the PS202 fermentation

由图3可见, 生长因子对 PS202 多糖的发酵有明显的促进作用。当生长因子添加量为 1% 时, 菌体干重增

21.9%，而胞外多糖产量增加7.2%。继续添加生长因子，多糖产量呈下降趋势，表明生长因子对PS202的生产与分泌有一定的影响。

2.2 正交试验

根据单因素试验结果，选择对发酵影响较大的蔗糖、牛肉膏、生长因子进行正交试验，因素水平见表1，结果和方差分析见表2、表3。

表1 $L_9(3^4)$ 正交因素水平表

Table 1 The factor design of orthogonal experiment ($L_9(3^4)$)

水平	A 蔗糖/%	B 牛肉膏/%	C 生长因子/%
1	3	0.15	0.8
2	4	0.2	1
3	5	0.25	1.2

表2 正交试验结果与极差分析

Table 2 extreme value analysis of orthogonal experiment

编号	A	B	C	误差列	多糖干重/%
1	1	1	1	1	1.78
2	1	2	2	2	2.56
3	1	3	3	3	2.49
4	2	1	2	3	2.70
5	2	2	3	1	3.01
6	2	3	1	2	2.40
7	3	1	3	2	2.87
8	3	2	1	3	2.92
9	3	3	2	1	2.98
均值1	2.227	2.45	2.367	2.59	
均值2	2.703	2.83	2.747	2.610	
均值3	2.923	2.623	2.790	2.703	
极差	0.646	0.38	0.423	0.113	

表3 方差分析表

Table 3 the square value analysis

因素	偏差平方和	自由度	F比	F临界值	显著性
A	0.649	2	29.500	19.000	显著
B	0.217	2	9.864	19.000	
C	0.325	2	14.773	19.000	
误差	0.022	2			

根据表2分析可看出，影响PS202胞外多糖产量

的各因素的主次顺序依次是 A、C、B。最佳发酵条件是：蔗糖 5%，牛肉膏 0.2%，生长因子 1.2%；最佳培养基(%)为：蔗糖 5.0；牛肉膏 0.2； $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05； KH_2PO_4 0.15； $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5；生长因子 1.2； $CaCO_3$ 0.3；pH 7.2~7.5。由表3可以看出，方差分析结果与正交试验结果一致，蔗糖浓度的影响最为显著。

据此以所得优化结论配制培养基作追加试验与未优化前的作对比，每个试验五个平行，结果见表4。从表4可看出优化结果明显，多糖产量提高了20%。

表4 优化前后发酵结果对比

Table 4 the Comparison Result of Before and After Optimized

Fermentation		
培养基	多糖均产量/%	菌体均干重/%
优化前	2.58	0.257
优化后	3.135	0.39

3 结论

试验表明，用本试验所采用的工艺条件对PS202多糖的生产菌株进行发酵生产时，最佳碳源为蔗糖5%；最佳氮源为牛肉膏0.2%；最佳生长因子添加量为1.2%，多糖产量达3.135%。

参考文献

- [1] N Ohno, Y Adachi, I Suzuki, et al, Antitumor activity of a beta-1,3-glucan obtained from liquid cultured mycelium of *Grifola* *indosa*. *J Pharmacobiodyn*, 1986, 9(10): 861-864.
- [2] Wang H X, Ng T B, Ooi V, et al. Apolysaccharide-peptide complex from cultured mycelia of the mushroom *Tricholoma* among olicum with immuno enhancing and antitumor activities. *J. Biochem Cell Biol*, 1996, 74(1): 95
- [3] 陈明. 真菌多糖抗肿瘤研究的进展[J]. 食用菌, 1993, (6): 41-42
- [4] Jie Zhang, Guangying Wang, Hang Li et al, Antitumor activity protein-containing Glycans from the Chinese mushroom *Songshan Lingzhi*, *Gandoma tsuge* mycelium, *Biosci Biotech Biochem*, 1994, 23(4): 1202-1205
- [5] 詹小北. 食用胶的生产、性能与应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2003.3