

利用麦芽根、淀粉废水高产普鲁兰多糖 短梗霉菌株选育的研究

邵 荣, 余晓红, 刘珊珊
(盐城工学院化学与生物工程学院, 江苏 盐城 224003)

摘 要: 将出芽短梗霉 G2m3.44 经紫外和微波诱变后, 挑选出一株产色素含量较低、产短梗霉多糖含量较高的菌株 UV-63-MW-15。经固定化后, 接种于麦芽根、淀粉废水糖化液中进行发酵。结果显示, 其多糖产量高出游离细胞 UV-63-MW-15 的 26.5%, 是游离原始出发菌株 G2m3.44 细胞所产多糖量的 2.63 倍。

关键词: 短梗霉多糖; 淀粉废水; 麦根; 紫外诱变; 微波

Screening of High Pullulan Polysaccharide-producing *Aureobasidium Pullulans* Fermenting Starch Wastewater and Malt Root

SHAO Rong, YU Xiao-hong, LIU Shan-shan
(College of Chemistry and Biological Engineering, Yancheng Institute of Technology, Yancheng 224003, China)

Abstract: The strain, UV-63-MW-15 producing less pigment but more pullulan polysaccharide was screened from *Aureobasidium pullulans* G2m3.44 mutagenized by ultraviolet and microwave. After being immobilized, the strain was inoculated into the starch wastewater added with ground malt root to produce pullulan polysaccharide. The yield of pullulan is higher 26.5% than that of the pullulan polysaccharide produced by the free UV-63-MW-15 strain, and is 2.63 times of that of the pullulan polysaccharide produced by the free original strain.

Key words: pullulan polysaccharide; starch waste water; malt root; ultraviolet mutagenesis; microwave

中图分类号: TS201.3; TQ92

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)09-0355-03

短梗霉多糖, 又名普鲁兰多糖, 是由出芽短梗霉分泌的一种新型胞外微生物多糖^[1-2], 其产量和性能与菌种特性密切相关。菌种是发酵的“灵魂”, 要进行麦芽根、淀粉废水生产短梗霉多糖的工艺优化研究, 必须先对出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*)进行研究^[3-4]。要求菌种具备“活性高、起发速度快、产糖量高、色素产率低”等优良特性^[5], 因此, 先进行出芽短梗霉菌的诱变研究工作, 采用紫外和微波复合诱变后, 以模拟淀粉工业废水作为底物, 先进行间歇性驯养工作, 再进行连续驯养工作, 筛选出产短梗霉多糖含量较高的一株菌株。经固定化后, 进行麦根、淀粉废水糖化液的发酵, 进行短梗霉多糖的生产, 以期选育出利用麦芽根、淀粉废水糖化液发酵生产短梗霉多糖的优良菌株。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

出芽短梗霉菌(*Aureobasidium pullulans*) 盐城工学院实验室; 麦芽根 盐城金威麦芽厂; 淀粉废水由本实验室模拟工业淀粉废水组成制备, 其组成如下(mg/L): 可溶性淀粉 1000、硫酸铵 12、氯化钠 280、磷酸二氢钾 5、蛋白胨 120、无水硫酸镁 10、碳酸氢钠 12、无水氯化钙 2。

海藻酸钠 郑州市鸿业食品添加剂有限公司; 酵母抽提物 中国医药(集团)上海化学试剂公司; 七水硫酸镁 天津市化学试剂一厂; 葡萄糖 天津市大茂化学试剂厂; 丙酮 江都市药物化工厂; 乙醚 上海炎展化工实业有限公司; 硫酸铵 江苏无锡市健业试剂化工有限公司; 蛋白胨 上海化学试剂有限公司; 琼脂 上海三爱思试剂有限公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

150A 数显生化培养箱 江苏金坛亿通电子有限公司; HH-8 数显恒温水浴锅 江苏金坛荣华仪器有限公司

收稿日期: 2008-04-12

基金项目: 江苏省高校自然科学基金项目(07KJD180229)

作者简介: 邵荣(1973-), 男, 副教授, 博士, 研究方向为生物化工。E-mail: sn@ycit.cn

司; PHS-2C 酸度计 上海伟业仪器厂; XBP-B13 双孔显微镜 北京清大德人科技有限公司; SW-CJ-1F 单人双面净化工作台 苏州净化设备有限公司; YXQ.SG41.280A 手提式压力蒸汽灭菌器 上海医用核子仪器厂; 750WG23 格兰仕微波炉 格兰仕微波炉电器有限公司; 其余均为实验室常规仪器。

1.3 方法

1.3.1 培养基制备

1.3.1.1 种子培养基制备

葡萄糖 5%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.06%、 K_2HPO_4 0.5%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04%、NaCl 0.1%、酵母抽提物 0.04%，于 121℃ 灭菌 20min。

1.3.1.2 发酵培养基制备

麦芽根粉碎过 20 目→按 50g/L 的比例添加到淀粉废水中→浸渍(38~40℃, 30min)→Pr 休止 I (45℃, 30min)→Pr 休止 II (55℃, 30min)→第一段糖化(63℃, 40min)→第二段糖化(68℃, 至碘液反应合格)→升温(76~78℃)→过滤→洗槽(残糖为 1~1.5BX)→麦芽根汁与工业淀粉废水的混合糖化汁→调节 pH 值→杀菌

1.3.2 菌种诱变

1.3.2.1 紫外诱变

量取单孢子悬液 10ml，加入无菌培养皿中，置振荡器上，以 15W 的紫外灯于 25cm 处照射 60s。紫外线照射后，暗修复 2h。

1.3.2.2 微波诱变

挑取紫外诱变突变菌株，进行种子液培养，制取单孢子菌悬液，以脉冲频率为 2450MHz 的 750W 家用微波炉，将装有菌悬液的三角瓶置于冰水中，在微波辐照的过程中，每辐照 5s 停止一次，使菌悬液温度最终保持在 20℃ 左右，共微波辐照 10s。

1.3.3 固定化出芽短梗霉的制备方法

采用诸葛健等^[6]的方法，制备步骤如下：将经紫外和微波诱变后的出芽短梗霉接入种子培养基中，恒温振荡器中 28℃ 振荡培养。离心收获菌体并用无菌水洗涤两次；将 2.5g 湿菌体悬于 5ml 无菌去离子水中；加入 5ml 4% 藻酸钠溶液，充分混匀；将 50ml 0.05mol/L CaCl_2 溶液移入 1 只三角瓶中，将头皮静脉针通过三角烧瓶口的棉塞伸入三角瓶内，并与 10ml 注射器连接。将此浸入 37℃ 水浴中 10min；将藻酸钠菌体混悬液移入注射器中，适度加力，将藻酸钠菌体悬液滴入 0.05mol/L CaCl_2 溶液中；滴完，将三角瓶移入 20~22℃ 水浴中，放置 1h；倾去溶液，加入 100ml 无菌去离子水冲洗 1 次；重新加入 50ml 0.05mol/L CaCl_2 溶液，4℃ 平衡过夜。

1.3.4 短梗霉多糖的发酵方法^[7]

在 pH6.5、转速 150r/min 的培养基中接入短梗霉菌种子液，接种量为 5%，于 28℃ 发酵 120h。

1.3.5 短梗霉多糖的提纯方法

发酵结束后，取发酵液离心去除菌丝体和不溶性物质，在上层多糖清液中加入两倍体积的无水乙醇，于 4℃ 条件下静置 20h，使其充分沉淀，最后离心沉淀。沉淀物用丙酮、乙醚冲洗，菌丝体和沉淀物于 50℃ 下烘干。

2 结果与分析

2.1 紫外线诱变及微波诱变后低产色素高产短梗霉多糖菌株的选育

2.1.1 紫外线诱变实验

经紫外处理 60s 的出芽短梗霉悬浮液，致死率达到 85.2%。稀释 10^2 倍后，分别取 0.1ml 涂布种子平板三份，并与未进行紫外照射的原出发菌株平板进行对照。结果表现，对照平板上出现大量生长菌，菌落以黑色为主，呈圆形，中心隆起，表面光滑，湿润，不易挑取，生长后期有菌丝体产生。紫外诱变平板上菌落数明显减少，且菌落色泽都有变浅的趋势，出现了灰色、粉红色、甚至白色的菌落。有些菌落表面出现了干皱的现象，生长后期产生菌丝体的菌落数很少，绝大部分菌落生长后期无菌丝体产生。菌落大小呈不规则变化，有些变大，也有较对照变小。分别挑取于上述紫外诱变平板上生长的在菌落颜色、菌丝体产生情况、直径大小等方面较有典型的菌落共 30 个，涂布种子平板 30 个，25℃ 培养 3d 后，出现多种颜色菌落，共挑出 80 个白色单菌落。将 80 株菌落培养进行低温发酵实验，与出发菌株 G2m3.44 控制相同的发酵工艺。其中 10 株菌的测定结果见表 1。

表 1 短梗霉 G2m3.44 及其紫外诱变株的发酵特征

Table 1 Respective fermentation characteristics of *Aureobasidium pullulans* G2m3.44 and its mutant by ultraviolet irradiation

编号	菌落颜色	发酵液最终颜色	发酵液最终 pH 值	多糖产量(g/L)
G2m3.44	黑色	墨绿色	4	12.52
UV-5	红色	红色	3.6	8.09
UV-13	灰色	浅灰色	3.3	17.06
UV-27	白色	白色	3.1	18.01
UV-31	淡黄色	淡黄色	2.8	15.93
UV-43	粉红色	粉红色	3.9	7.95
UV-58	黄色	黄色	4.2	13.87
UV-63	白色	白色	3.5	20.24
UV-67	粉红色	粉红色	3.4	9.26
UV-74	白色	白色	3.2	10.48
UV-80	白色	白色	3.7	12.43

选取 UV-13、UV-27、UV-31、UV-63 四菌株进行

传代5代后再次发酵实验,结果见表2。根据表2的结果最终选取UV-63进行微波诱变。

表2 第5代短梗霉G2m3.44及其紫外诱变株的发酵特征

Table 2 Fermentation characteristics of the 5th generation *Aureobasidinm pullulans* G2m3.44 and its mutant by ultraviolet irradiation

编号	菌落颜色	发酵液最终颜色	发酵液最终pH值	多糖产量(g/L)
G2m3.44	黑色	墨绿色	3.9	12.39
UV-13	灰色	浅灰色	3.5	17.1
UV-27	白色	白色	3.2	17.98
UV-31	淡黄色	淡黄色	3	15.95
UV-63	白色	白色	3.4	20.16

2.1.2 微波诱变效果实验

将UV-63菌株进行液态培养,制备成菌悬液,经微波诱变后,致死率达到90.6%。进行平板培养,挑取菌落大而饱满的突变菌株进行摇瓶发酵实验,各菌株菌落特征、发酵情况见表3。得到的白色突变菌株UV-63-MW-15,传代5代后,其摇瓶发酵产量是出发菌株的2.11倍。

表3 短梗霉UV-63及其微波诱变株的发酵特征

Table 3 Respective fermentation characteristics of *Aureobasidinm pullulans* UV-63 and its mutant by microwave

编号	菌落颜色	发酵液最终颜色	发酵液最终pH值	多糖产量(g/L)
UV-63	白色	白色	3.6	20.18
UV-63-MW-2	白色	浅灰色	3.8	14.1
UV-63-MW-9	白色	白色	3.3	19.98
UV-63-MW-15	白色	白色	3.5	25.95
UV-63-MW-28	白色	白色	3.4	22.57

2.2 固定化出芽短梗霉的发酵试验

将出芽短梗霉诱变高产菌株UV-63-MW-15固定化后,接入麦根、淀粉废水糖化液进行发酵,同时以游离出芽短梗霉细胞发酵作为对照,结果如表4所示。可以看出,利用固定化出芽短梗霉诱变高产菌株UV-63-MW-15发酵麦根、淀粉废水糖化液,多糖产量高出游离细胞UV-63-MW-15的26.5%,是游离原始出发菌株G2m3.44细胞所产多糖量的2.63倍。

表4 固定化和游离短梗霉UV-63-MW-15发酵实验

Table 4 Results of fermentation experiments of immobilized *Aureobasidium pullulans* and free one UV-63-MW-15

菌株处理方式	发酵液最终颜色	发酵液最终pH值	多糖产量(g/L)
游离细胞 G2m3.44	黑色	3.9	12.46
游离细胞 UV-63-MW-15	白色	3.4	25.89
固定化细胞 UV-63-MW-15	白色	3.6	32.75

3 结 论

将出芽短梗霉G2m3.44经紫外诱变后,筛选到一株低产色素、高产短梗霉多糖的变异菌株UV-63,再将其经微波诱变后,得到一株白色突变菌株UV-63-MW-15,其摇瓶发酵产量是出发菌株的2.11倍。将其固定化后接入麦根、淀粉废水糖化液中发酵,其多糖产量较游离细胞增长26.5%。由此可见,将菌株经紫外、微波诱变,以及固定化后,用于短梗霉多糖的发酵生产,可以优化麦根、淀粉废水生产短梗霉多糖的菌种,进一步提高多糖的产量。

参考文献:

- [1] 杨学领. 普鲁兰多糖应用现状研究[J]. 武汉生物工程学院学报, 2007 3(3): 166-168.
- [2] 王浩, 张晓军. 一种新型的胞外多糖—普鲁蓝[J]. 中国食品添加剂, 2005(6): 60-62.
- [3] LEATHERS T D. Bioconversions of maize residues to value-added coproducts using yeast-like fms[J]. Yeast Research, 2003(3): 133-140.
- [4] 王长海, 李艳红, 臧丽华, 等. 短梗霉高产菌的选育及其10 L升罐发酵[J]. 烟台大学学报, 2002(1/2): 107-111.
- [5] 邓长江, 李长清. 产普鲁兰糖出芽短梗霉菌株的初步筛选[J]. 食品与药品, 2007, 9(2): 18-20.
- [6] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994: 544-545.
- [7] 张汉波, 程立忠, 沙涛. 控制pH环境对出芽短梗霉胞外多糖合的影响[J]. 微生物学通报, 2001, 28(1): 35-38.