

微生物聚多糖 PS-238 合成条件的研究

李 莎 徐 虹 石宁宁

(南京工业大学制药与生命科学学院,南京 210009)

摘 要 一株产碱杆菌 *Alcaligenes* sp. NX-3 可分泌一种新型高分子多糖 PS-238,该多糖具有耐高温、耐酸碱、耐盐等优良特性。碳源、氮源等培养基组分对该多糖产量有重要的影响。文中采用单因素的实验方法确定了发酵培养基的碳源、氮源分别为蔗糖和蛋白胨,然后采用中心复合设计法对培养基的主要成分进行了分析和优化。结果表明,碳源是极显著的因素, K_2HPO_4 次之。最优发酵培养基配方为:蔗糖浓度 49 g/L,蛋白胨浓度 6.5 g/L, K_2HPO_4 2 g/L, $MgSO_4$ 0.3 g/L,根据预测的最优发酵水平的营养配比,产量由 10.78 g/L 提高至 22.85 g/L。

关键词 细菌多糖, *Alcaligenes* sp., 发酵, 中心复合设计法

微生物代谢胶由于其结构和性质的多样性,具有广泛的工业应用前景,因此,国际上对各种微生物代谢多糖的研究颇为热门,目前全世界新型的微生物多糖年增长量在 30% 左右,工业总产值可达 50~100 亿美元。本实验室保藏的一株产碱杆菌 *Alcaligenes* sp. NX-3 可分泌一种高分子多糖,分子量高达数百万。它的结构骨架由 D-葡萄糖、D-葡萄糖醛酸、D-葡萄糖和 L-鼠李糖的单元组成,侧链由单链的 L-甘露糖或单链的 L-鼠李糖构成(如图 1 所示)。

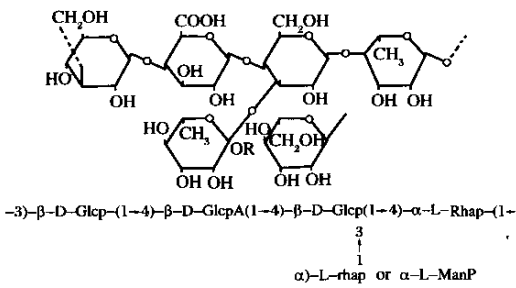


图 1 PS-238 结构式

该多糖水溶液呈假塑流体特征,耐酸碱,在 pH 2~13 的范围内性质稳定,耐热性好,在 150℃ 内不降解,耐盐性好(另文发表),由于该多糖水溶液出色的流变学特性,有望将其作为稠化剂、悬浮剂和乳化剂等,应用于工农业生产。文中对 *Alcaligenes* NX-3 发酵生产 PS-238

的营养条件进行了初步的研究。

1 材料与方法

1.1 菌种

产碱杆菌 *Alcaligenes* sp. NX-3,本实验室保藏。

1.2 培养基

斜面培养基(g/L):葡萄糖 10,蛋白胨 10,牛肉膏 3,NaCl 5,琼脂 20。

种子培养基(g/L):蔗糖 20,酵母膏 1, K_2HPO_4 2, $MgSO_4$ 0.1, pH 7.0~7.2, 121℃ 灭菌 15 min。

发酵培养基(g/L):碳源 30,氮源 8, K_2HPO_4 2, $MgSO_4$ 0.1, pH 7.0~7.2, 121℃ 灭菌 15 min。

1.3 培养方法

液体种子培养:接种活化后的斜面菌苔 2 环于种子培养基中,装液量 50 mL/500 mL, 30℃ 200 r/min 摇瓶培养 16 h。

发酵培养:将上述培养好的种子液按 10% 的接种量接入装有 80 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中培养, 30℃, 200 r/min 摇瓶培养 72 h。

1.4 分析方法

(1) 生物量测定 取 1 mL 发酵液稀释 25 倍

第一作者 硕士研究生(徐虹为通讯作者)。

收稿时间 2004-10-18

后,752 型分光光度计在 600nm 处测得。

(2)发酵液粘度测定 :NDJ-1 型旋转粘度计 4 号转子 30 r/min 室温测得。

(3)pH 采用精密 pH 计测定。

(4)多糖产量 :发酵液在 70~80℃ 的水浴中灭活 15 min,待冷却后加入 2 倍体积的 95% 乙醇,玻璃棒搅动至出现絮状沉淀,4℃ 保温过夜,离心去除上清液,得粗品,将粗品复溶于蒸馏水后,用 Sevag 法除蛋白,流水透析过夜,透析液浓缩后经乙醇沉淀,将沉淀物于 50℃ 真空干燥至恒重,电子天平称重。

2 结果与讨论

2.1 碳源对 PS-238 合成的影响

首先对发酵培养基的碳源作单因素比较试验。实验中分别选择葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、玉米粉、甘油、乳糖、柠檬酸和富马酸作为碳源。各碳源对细胞生长和多糖合成的影响如表 1 所示。结果表明,NX-3 在以甘油、柠檬酸、富马酸为唯一碳源的培养基中很难生长,可以利用乳糖,但细胞合成产物的能力较低,能较好地利用玉米粉,但提取分离比较困难;相比而言,对葡萄糖、蔗糖和麦芽糖的利用效果较好,葡萄糖相比于蔗糖,产物粘度高,但产量较低,可能是由于不同碳源对产物分子量的影响所致,但有待于进一步验证。就产量而言,蔗糖最优。

表 1 碳源对 PS-238 合成的影响

碳源	pH	细胞生长 (A_{600})	粘度 /mPa·s	产量 /g·L ⁻¹
葡萄糖	5.28	0.426	4000	8.44
蔗糖	5.30	0.474	3500	10.78
麦芽糖	5.27	0.588	2200	7.28
玉米粉	6.36	0.574	2100	9.24
甘油	8.5	0.087	—	—
乳糖	4.43	0.284	—	—
柠檬酸	8.71	0.016	—	—
富马酸	8.28	0.044	—	—

2.2 氮源对 PS-238 合成的影响

实验中考察了有机氮源蛋白胨、酵母膏、牛肉膏、尿素和无机氮源(NH_4)₂SO₄、NH₄Cl、NH₄NO₃、(NH_4)₂HPO₄ 对发酵的影响,添加浓度均为 0.8%。菌株在 NH₄Cl、NH₄NO₃ 为单

一氮源的培养基中几乎不产胶,其余结果如图 2 所示。有机氮源中牛肉膏和蛋白胨效果较好,无机氮源中(NH_4)₂SO₄ 较好,以单一有机氮源为氮源时细胞生长和产物积累明显优于无机氮源。综合考虑得出蛋白胨为最佳氮源。

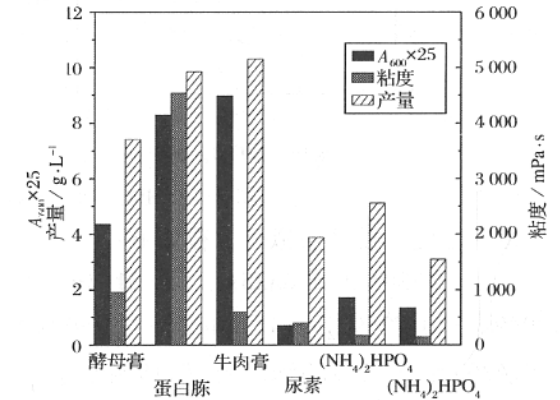


图 2 氮源对 PS-238 合成的影响

2.3 K₂HPO₄ 和 MgSO₄ 浓度对 PS-238 合成的影响

K⁺ 和 Mg²⁺ 是细胞中许多酶的激活剂,实验中考察了不同浓度的 K₂HPO₄ 和 MgSO₄ 对 PS-238 合成的影响,浓度范围分别为 1~5 g/L 和 0.1~0.5 g/L。图 3 的结果表明,K₂HPO₄ 浓度 2 g/L,MgSO₄ 浓度在 0.4 g/L 时最有利于产物积累。这一结果还有待于正交实验的进一步确定。

2.4 PS-238 发酵条件的正交优化实验

根据以上单因素实验结果,确定了营养条件正交试验的几种考察因素及其水平(表 2),采用 4 因素标准中心复合设计分析法安排正交试验,利用 statistica6.0 软件求得回归方程的各项因素的系数,确定各因素的影响程度,最终得到最优发酵水平的营养条件配比。

表 2 正交试验因素水平表

因素	水平				
	-1.68179	-1	0	1	1.68179
A:蔗糖/g·L ⁻¹	23.18210	30	40	50	56.81790
B:蛋白胨/g·L ⁻¹	6.31821	7	8	9	9.68179
C:K ₂ HPO ₄ /g·L ⁻¹	1.31821	2	3	4	4.68179
D:MgSO ₄ /g·L ⁻¹	0.31821	1	2	3	3.68179

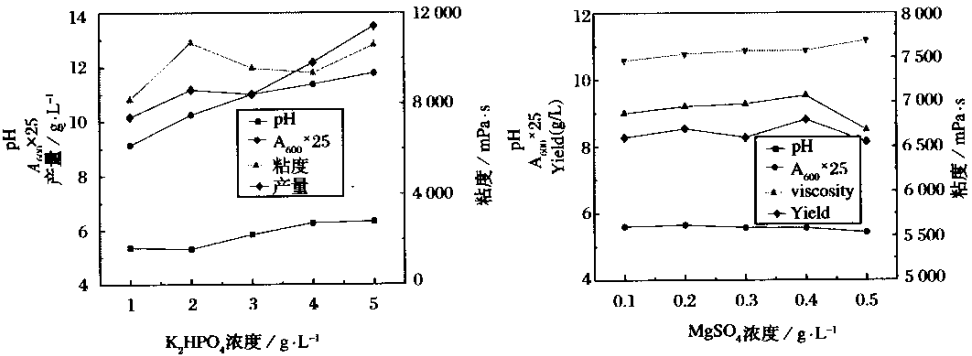


图3 K₂HPO₄和MgSO₄浓度对PS-238合成的影响

由中心复合设计法拟合方程如下：

$$y = 18.2305 + 2.6525x_1 - 0.3133x_1^2 + 0.2949x_2 - 0.7259x_2^2 - 1.1144x_3 - 1.7509x_3^2 + 0.4263x_4 + 0.1286x_4^2 + 0.1904x_1x_2 - 1.7517x_1x_3 + 0.2477x_1x_4 + 0.4708x_2x_3 + 0.6588x_2x_4 + 0.3843x_3x_4$$

其中 y 为多糖产量(g/L) ,x₁、x₂、x₃ 和 x₄ 分别为蔗糖、蛋白胨、K₂HPO₄ 和 MgSO₄ 的浓

度 ,方程决定系数 R₂=0.9623。

分析结果表明 ,蔗糖是影响 PS-238 发酵的最显著因素 ,碳源过多 ,在发酵初期易形成高的 C/N 抑制菌体生长 ;氮源过多 ,会使 pH 值偏高 ,不利于中性代谢产物的积累 ,统计分析得出各因素对发酵影响的显著次序为 :蔗糖 > K₂HPO₄ > 蛋白胨 > MgSO₄ ,此外蔗糖与 K₂HPO₄ 的交互作用也是统计显著的。

表 3 实验值与方程预测值对照表

编号	水 平				产 量/g·L ⁻¹		
	A	B	C	D	实验值	预测值	相对误差/%
1	1	1	1	-1	13.774	14.214	-3.095
2	1	1	-1	-1	20.278	19.773	2.553
3	1	-1	1	1	14.71	15.180	-3.096
4	-1	1	-1	1	13.252	12.747	3.962
5	1	-1	-1	1	21.59	21.085	2.395
6	-1	-1	1	-1	12.224	12.694	-3.702
7	-1	1	1	1	15.262	15.732	-2.988
8	-1	-1	-1	-1	13.634	13.129	3.846
9	-1.68179	0	0	0	12.858	12.883	-0.194
10	1.68179	0	0	0	21.78	21.805	-0.115
11	0	-1.68179	0	0	15.656	15.681	-0.159
12	0	1.68179	0	0	16.648	16.673	-0.150
13	0	0	-1.68179	0	13.968	15.152	-7.814
14	0	0	1.68179	0	12.538	11.404	9.944
15	0	0	0	-1.68179	17.852	18.230	-2.073
16	0	0	0	1.68179	19.286	19.230	0.291
17	0	0	0	0	18.312	17.879	0.135
18	0	0	0	0	17.208	17.679	2.664

表 3 中模型方程对样本预测的相对误差基本在 ± 5.0 % 以内 ,表明中心复合设计能够较好地 对 PS-238 发酵生产的营养条件进行预测和

优化。以提高多糖产量为目的 ,预测获得的最优的营养条件组合为 :蔗糖浓度 49 g/L ,蛋白胨浓度 6.5 g/L ,K₂HPO₄ 2 g/L ,MgSO₄ 0.3 g/L ,

预测产量 26.45 g/L。通过验证实验得到实际摇瓶产量为 22.85 g/L。

2.5 摇瓶发酵过程曲线

通过上述工作确定了发酵培养基的成分, 利用此最优配方得到的 PS-238 发酵过程曲线如图 4 所示。

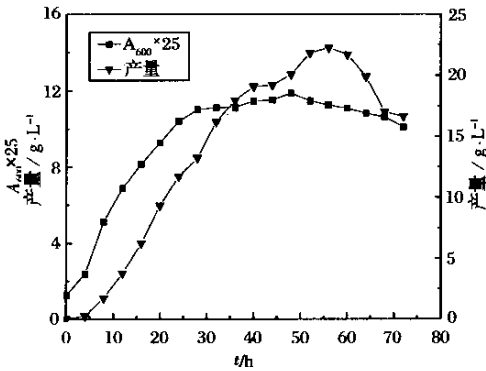


图 4 摇瓶发酵过程曲线

发酵培养基接种龄为 16 h 的种子液后, 经 4 h 迟滞期后到达对数生长期, PS-238 的合成几乎与菌体生长同步, NX-3 从 8 h 开始合成 PS-238, 随着发酵的进行, 至 28 h, 菌体生长进入稳定期, 此时产物合成曲线也趋于平缓, 48 h 后菌体生长缓慢下降, 产量却出现较大幅度的增长, 至 56 h 达到产量峰值 22.85 g/L。这一过程可能是由于菌体生长消耗了大量氮源, 导致发酵液体系中 C/N 增大, 有利于产物的合成。推测在菌体生长稳定期后期, 较高水平的 C/N 有利于 PS-238 的合成。详细的合成机理有待于进一步的探讨。

Production of a Microbial Polysaccharides by Fermentation

Li Sha Xu Hong Shi Ningning

(College of Life Science and Pharmacy, Nanjing University of Technology, Nanjing, 210009)

ABSTRACT This paper is about the study on the strain of *Alcaligenes* sp. NX-3 which could produce a new type of biopolymer PS-238. PS-238 has the excellent stability towards temperature, pH and salts. It belongs to the family of microbial polysaccharides with a wide range of industrial applications. Studies on the nutritional requirement for optimal polysaccharide production were carried out. The carbon source and nitrogen source were first investigated respectively. Then central complex design method was applied for the optimization of cultural medium. It was shown that carbon source was the most remarkable factor for the production of PS-238. The concentration of K_2HPO_4 was also very important. By using the optimized medium, the yield of PS-238 increased from 10.78 g/L to 22.85 g/L.

Key words microbial polysaccharides, *Alcaligenes* sp., fermentation, central complex design method

3 结 论

研究表明, 在 *Alcaligenes* sp. NX-3 发酵生产 PS-238 的过程中, 发酵培养基的优化对于提高产量有明显的效果, 通过单因素结合中心复合设计的实验分析方法, 揭示了培养基中 4 种成分对发酵水平的影响程度, 并得到最优培养基的配比: 蔗糖 49 g/L, 蛋白胨 6.5 g/L, K_2HPO_4 2 g/L, $MgSO_4$ 0.3 g/L, 在这一最优培养基上, 产量由 10.87 g/L 提高到 22.85 g/L。

参 考 文 献

- 1 Tako M, Kiriaki M. Rheological properties of welan gum in aqueous media [J]. Agric Biol Chem, 1990, 54 (12): 3079~84
- 2 王卫平. 食品品质改良剂: 亲水胶体的性质及应用 (之六) 微生物代谢胶 [J]. 食品与发酵工业, 1997, 23(1): 76~80
- 3 Welan gum in cement compositions [P]. EP0290198, 1988
- 4 Madhavan K, Nampoothiri, Reeta Rani Singhania, Sabarin C. etc. Fermentation production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis* [J]. Process Biochemistry, 2003, 38: 1514~1519
- 5 张惟杰. 复合多糖生化研究技术 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1987
- 6 卫功元. 产阮假丝酵母发酵法生产谷胱甘肽研究 [D]. 江南大学博士论文, 2003, 12
- 7 李卫旗, 吴雪昌. 培养基的组成对黄原胶发酵产量与质量的影响研究 [J]. 工业微生物, 1996, 26 (1): 17~22
- 8 马正飞, 殷翔. 数学计算方法与软件的工程应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002