

文章编号 :1009-038X(2003)01-0016-05

出芽短梗霉产色素能力弱化菌株的筛选

朱一晖, 张丽敏, 詹晓北

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214036)

摘 要:出芽短梗霉在发酵过程中会产生一种与黑色素相似的黑色物质,并且这种物质会牢固地粘附在短梗霉多糖上.对出芽短梗霉 *Aureobasidium pullulans* B-1 菌株进行⁶⁰Co 诱变,获得了一株产色素能力缺失型菌株 Co3,其菌落和发酵液颜色为白色或淡绿色.红外光谱和磁核共振图谱表明该菌株的产物与标准短梗霉多糖样品有相同的结构.

关键词:出芽短梗霉;短梗霉多糖;⁶⁰Co 诱变;产色素能力弱化菌株

中图分类号:Q 815

文献标识码:A

Isolation of *Aureobasidium pullulans* ⁶⁰Co Mutagensis Strains that Produce Pullulan with Reduced Pigmentation

ZHU Yi-hui, ZHANG Li-min, ZHAN Xiao-bei

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: *Aureobasidium pullulans* releases a melanin-like black pigment during the cultivation and the pigment was tightly adhered to the pullulan. The feasibility of ⁶⁰Co mutagenesis for pigment-free pullulan production was studied on *Aureobasidium pullulans* B-1 strain. A pigment-free mutant (Co3) was obtained. The colony and broth of strain Co3 are white or light green. Analysis of infrared spectra and ¹³C-NMR spectrum confirmed that the product was identical with the standard pullulan sample.

Key words: *Aureobasidium pullulans*; pullulan; ⁶⁰Co mutagenesis; pigment-free mutant

多糖是一类高分子化合物,在食品、化学及医药工业有着广泛的应用.传统的天然多糖和化学合成高分子化合物都有其局限性.微生物多糖生产周期远低于植物和海藻多糖,而且产量、产品质量和价格受季节和气候影响不大,并且可以安全地应用于食品、医药、化妆品等行业,可以被微生物降解.近年来微生物多糖研究得到了迅猛发展,其中有些已具备了工业应用价值并已工业化^[1].

短梗霉多糖是由出芽短梗霉(*Aureobasidium*

pullulans)合成的微生物多糖.它是一种天然的水溶性中性葡聚糖,无色,无味,无毒,具有良好的耐热性、耐盐性及耐酸碱性,可广泛应用于食品、化妆品、涂料、光敏树脂、肥料、铸造、烟草以及制药等工业^[1].

在发酵过程中,出芽短梗霉会分泌出与黑色素相似的黑色或墨绿色物质,这种物质会牢固地粘附在短梗霉多糖上,很难用一般方法除去,限制了短梗霉多糖的应用^[2,3].这种黑色素可以通过 Sevag

收稿日期:2002-06-27; 修回日期:2002-10-16.

基金项目:江苏省国际合作项目资助课题(BS99719).

作者简介:朱一晖(1976-),男,福建漳州人,工学硕士,助教.

分馏法^[4]去除,但是要完全去除黑色素,必须重复多次 Sevag 分馏法,而每一次除色素会损失大约 15% 的多糖,所以最终不含色素的短梗霉多糖得率很低.此方法仅适合于少量多糖的提取,应用在大量产品的提取上是不实际的.作者采用⁶⁰Co 诱变育种方法,以期获得产色素能力缺失突变株.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株 *Aureobasidium pullulans* B-1,作者所在实验室提供.

1.1.2 培养基

1) 种子培养基组分(g/dL):蔗糖 5, (NH₄)₂SO₄ 0.06, K₂HPO₄ 0.5, MgSO₄ 0.01, NaCl 0.1 酵母浸膏 0.06.

2) 斜面与平板培养基组分(g/dL):马铃薯 20, 蔗糖 2, 琼脂 2, pH 为 6.5.

3) 发酵培养基与种子培养基相同.

1.2 实验方法

1.2.1 培养方法

1) 发酵种子的培养:由斜面接一环种子至三角瓶,250 mL 摇瓶装液量 50 mL,28 ℃、200 r/min 培养 36 h,即为摇瓶种子液.取 5 mL 摇瓶种子液,接入装液量为 150 mL 的 500 mL 摇瓶,28 ℃、200 r/min 培养 24 h,即为发酵罐种子液.

2) 摇瓶培养:50 mL 摇瓶装液量 50 mL,接种量为 5%,28 ℃、200 r/min 培养 120 h.

3) 发酵罐培养:15 L 发酵罐(Biostat C10-3)的装液量为 9 L,接种量为 5%,发酵温度为 28 ℃,搅拌转速为 400 r/min,通气量为 1 L/(L·min),培养 144 h.

1.2.2 ⁶⁰Co 诱变方法

1) 出发菌株菌悬液的制备:方法参见文献[2].

2) 诱变方法:将制备好的菌悬液各 5 mL 移至 5 支试管中,按照照射剂量计算好照射距离,将 5 支试管分别放置于相应位置,照射时间为 30 min^[5].

3) 培养:取 0.5 mL 处理后的菌悬液进行稀释分离,涂布于土豆琼脂平面上,28 ℃培养 5 d.

1.2.3 分析方法

1) 菌体量的测定:见文献[2].

2) 短梗霉多糖的测定:见文献[2].

3) 致死率计算:

$$\text{致死率} = \frac{\text{照射前活菌数/mL} - \text{照射后活菌数/mL}}{\text{照射前活菌数/mL}}$$

4) 筛选方法:挑选白色、浅绿色,表面湿润的菌

落,转接到斜面,摇瓶培养,观察发酵液颜色,测定多糖含量.

1.2.4 短梗霉多糖结构鉴定方法

1) 短梗霉多糖纯化:发酵液在 7 000 r/min 离心 30 min,倾出上清液.上清液中加入两倍体积的无水乙醇,4 ℃放置 12 h.在 7 000 r/min 离心 20 min,倾去上清液,将沉淀的粗多糖用丙酮和乙醚反复冲洗,再溶于蒸馏水中.溶液置于截流相对分子质量为 12 000 ~ 14 000 的透析袋中,透析 3 d,中间换 10 次去离子水,得到的短梗霉多糖溶液用 Sevag 试剂法去蛋白.去蛋白后的短梗霉多糖溶液再置于截流相对分子质量为 12 000 ~ 14 000 的透析袋中,透析 3 d,中间换 10 次去离子水.透析后的溶液进行冷冻干燥,得到白色精制短梗霉多糖.

2) 红外光谱分析:采用石蜡油研磨法.取 5 mg 左右样品,置于 NaCl 盐片上,加入分析用液体石蜡,分散后轻轻研磨,涂成薄层,上机分析.

3) 核磁共振分析:干燥固体样品用溶剂 D₂O 溶解,pD 为 7,样品质量浓度 30 mg/mL 以上,温度 35 ℃,样品管外径为 5 mm,内标是二甲基硅戊烷磺酸钠(D.S.S.),图谱宽度 200.

2 结果与讨论

2.1 菌株的⁶⁰Co 辐射诱变

2.1.1 致死率计算与诱变剂量的选择 对培养好的平板菌落进行计数,按照致死率公式计算照射致死率,结果见图 1.

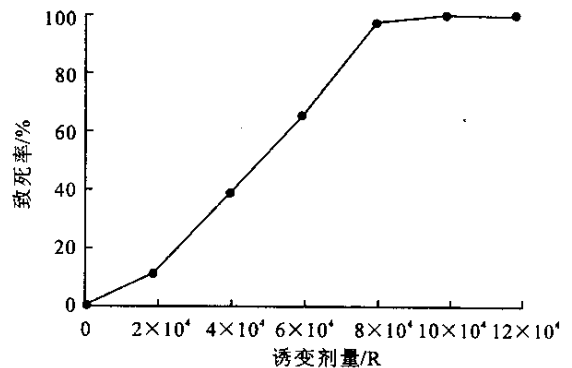


图 1 ⁶⁰Co 诱变剂量与致死率关系

Fig.1 Relation of ⁶⁰Co dosage and lethality

根据图 1 的结果,确定⁶⁰Co 诱变剂量为 8 × 10⁴ R.

2.1.2 诱变结果 按 1.2.2 所述方法进行诱变,得 20 余株菌落颜色为白色或淡绿色的诱变菌株.将所得菌株 5 d 转接一次平板,转接 3 次后,得 5 株性状较为稳定的菌株进行复筛,复筛结果见表 1.

表 1 ⁶⁰Co 诱变菌株主要性状

Tab.1 Fermentation properties of mutant and start strain			
菌株编号	菌体量/ (g/dL)	多糖产量/ (g/dL)	菌落及 发酵液颜色
Co1	1.2	1.1	白色
Co2	1.1	1.4	淡绿色
Co3	1.9	1.6	淡绿色
Co4	1.4	1.1	淡绿色
Co5	2.3	0.8	白色
出发菌株 B-1	2.0	2.1	黑色

将 Co3 菌株进行连续 3 次传代实验 ,摇瓶发酵结果见表 2.

表 2 Co3 菌株传代实验结果

Tab.2 Genetic stability test of strain Co3			
代数	菌体量/ (g/dL)	多糖产量/ (g/dL)	菌落颜色
1	1.7	1.5	淡绿色
2	1.9	1.3	淡绿色
3	1.9	1.6	淡绿色

从表 2 可以看出 ,菌株 Co3 经 3 次传代后 ,产量稳定在 1.5 g/dL 左右 ,菌落颜色为淡绿色.

2.1.3 产色素能力缺失突变株与原菌株产色素情况对比 Co3 菌落形态与原菌株对比见图 2.

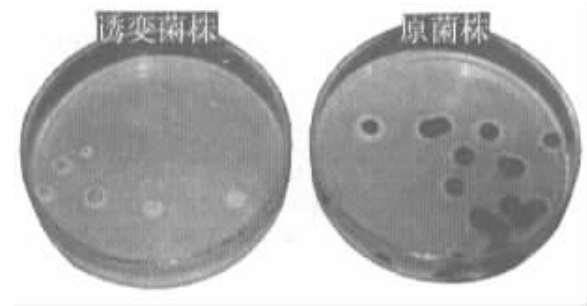


图 2 Co3 突变菌株菌落形态与原菌株对比

Fig.2 Comparison of colony of start strain and mutant

将 Co3 菌株和原菌株发酵液离心 ,去除菌体 ,将原菌株发酵液稀释 10 倍 ,Co3 发酵液不稀释 ,以纯水为空白 ,在 370 ~ 700 nm 的可见波长范围内进行扫描 ,产色素能力缺失突变株与原菌株的可见光谱吸收对比见图 3.

由图 3 可知 ,该菌株仍产少量色素 ,但与原菌株相比 ,色素已大幅度减少 .虽然在现在的发酵条件下该菌株多糖产量比原菌株低 ,也比国外文献报道略低 ,但由于色素的减少 ,大大简化了多糖纯化步骤 ,有利于保持多糖的生物活性 ,减少了提取过程中的多糖损失 .对该菌株发酵工艺条件进行研

究 ,可以进一步挖掘该菌的产糖能力 .

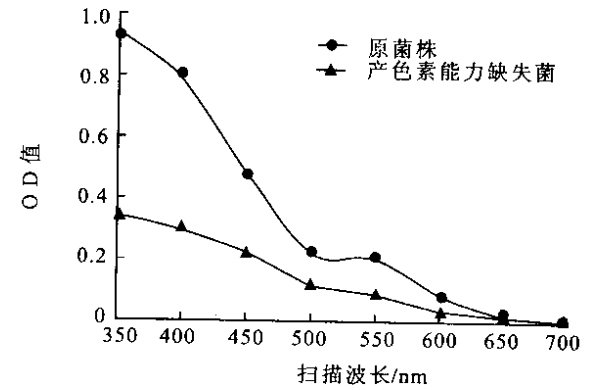


图 3 原菌株与产色素能力缺失菌株发酵液的可见光谱图

Fig.3 Spectrum of fermentation broth of start strain and mutant

2.2 发酵罐实验

按 1.2.1 所述实验方法进行 15 L 发酵罐实验 ,发酵曲线见图 4.

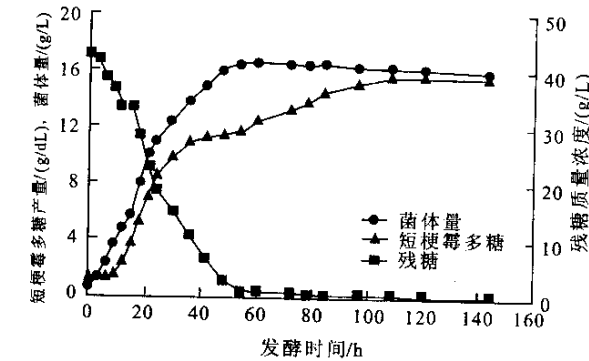


图 4 15 L 发酵罐发酵过程曲线

Fig.4 Growth curve and fermentation curve of strain Co3 in 15 L fermentor

从发酵曲线可以看出 ,蔗糖质量浓度在前 48 h 内迅速下降 ,在第 70 小时左右基本消耗完全 .在蔗糖质量浓度迅速下降的同时 ,发酵液 pH 值也随之下降 ,在第 30 小时 pH 下降至最低点 3 ,然后恒定在这个值 ,直至发酵结束 .菌体生长延迟期很短 ,在第 6 小时左右进入对数生长期 .菌体量在前 48 h 迅速增加 ,从第 48 小时开始 ,菌体生长进入稳定期 ,在发酵结束前 ,菌体量有少量减少 .短梗霉多糖的产生略滞后于菌体生长 ,发酵开始后 12 h 内几乎没有多糖产生 ,从第 12 小时后开始有多糖合成 ,第 16 小时以后多糖合成速度加快 ,最终多糖产量为 15.5 g/L .在整个发酵过程中 ,只有少量的色素产生 ,最终发酵液的颜色呈淡绿色 .与摇瓶实验相同 ,最终发酵液颜色比原始菌株浅 ,可以简化多糖提取过程 ,提高多糖的提取得率 ,并且通过对发酵条件的研究 ,可进一步提高该菌株多糖的产量 .

2.3 红外光谱分析

从红外光谱图(图 5)中可以看出,样品的吸收峰与标样的吸收峰完全一致.在 840 cm^{-1} 处有一吸

收峰,这表明该样品以 α -键为主要连接键.

2.4 核磁共振分析

核磁共振谱见图 6.

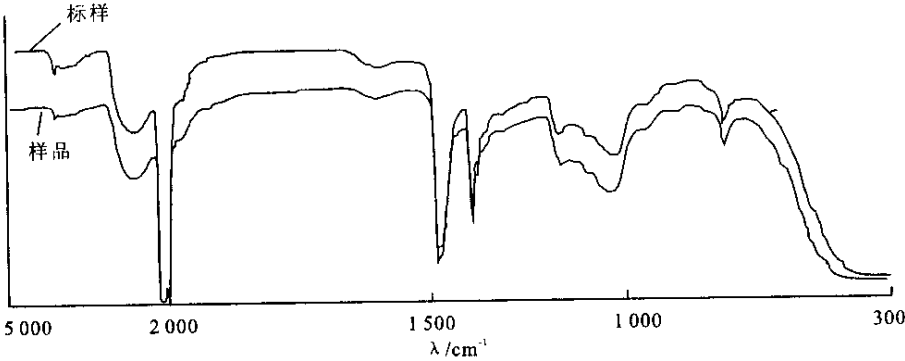


图 5 短梗霉多糖红外光谱图

Fig.5 Infrared spectrum of commercial pullulan and pullulan produced by Strain Co3

FX – 90Q NMR SPECTROMETER

#	PPM	Freq(Hz)	Intensity	#	PPM	Freq(Hz)	Intensity
1	101.76	2288.48	9431	8	73.60	1655.26	16721
2	101.29	2277.97	8893	9	72.62	1633.30	9896
3	99.59	2239.77	6295	10	71.94	1618.02	8461
4	80.31	1806.17	7001	11	69.01	1552.11	5909
5	79.93	1797.57	7319	12	63.24	1422.22	9065
6	75.43	1696.33	16631	13	62.98	1416.49	10415
7	73.73	1658.13	15812	14	20.01	449.95	9597

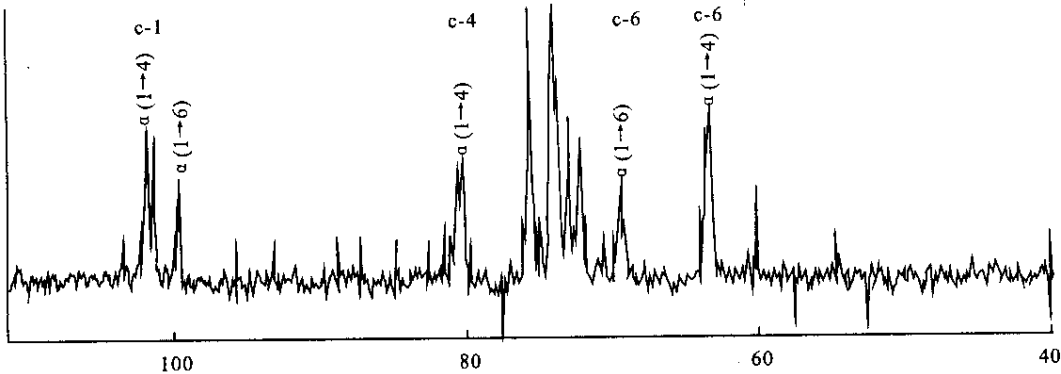


图 6 短梗霉多糖核磁共振谱图

Fig.6 NMR spectrum of pullulan produced by strain Co3

在异头碳区域有 3 个峰,分别对应于 α -1,4 连接(101.76,101.29)和 α -1,6 连接(99.59).化学位移为 80.31 和 79.93 的峰对应 α -1,4 连接的 C-4,化学位移为 63.24 和 62.98 的峰对应 α -1,4 连接的 C-6,化学位移为 69.01 的峰则对应于 α -1,6 连接的 C-6.其它化学位移在 70 ~ 80 之间的峰对应于糖链上其它位置的碳.由于在异头碳区域无其它的响应峰,这说明在该多糖样品中无其它的键型存在.短梗霉多糖典型分子结构见图 7.

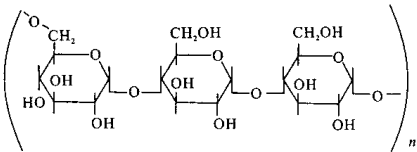


图 7 短梗霉多糖典型分子结构

Fig.7 Structure of pullulan

3 结 论

通过⁶⁰Co 诱变,筛选得到一株产色素能力缺失菌,摇瓶和 15 L 发酵罐发酵实验多糖产量为 15

g/L 左右,发酵液颜色为淡绿色.该菌株简化了多糖纯化步骤,有利于保持多糖的生物活性和提取过程中多糖的损失.对该菌株的多糖产物进行红外和核磁共振光谱分析,其结构与短梗霉多糖标样一致.

参考文献：

[1] S Yuen. Pullulan and its applications[J]. **Process Biochemistry** , 1974 (11) : 7 - 9 .
[2] Thomas J Pollock , Linda Thorne , Richard W Armentrout . Isolation of new *Aureobasidium* strains that produce high-molecular-weight pullulan with reduced pigmentation[J]. **Applied and Environmental Microbiology** , 1992 (3) : 877 - 883 .
[3] F Youssef , T Roukas , C G Biliaderis . Pullulan production by a non-pigmented strain of *Aureobasidium pullulans* using batch and fed-batch culture[J]. **Process Biochemistry** , 1999 , 34 : 355 - 366 .
[4] 张惟杰.糖复合物生化研究技术[M].杭州:浙江大学出版社,1994 .
[5] 詹晓北,郑志永,贾薇,等.大肠杆菌⁶⁰Co 诱变育种及其发酵生产聚唾液酸条件[J].无锡轻工大学学报,2000 ,19(4) : 21 - 25 .
[6] Gorin QAJ . Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides[J]. **Adv Carbohydr Chem Biochem** , 1981 , 38 : 13 - 104 .
[7] Brian J Catley , Alison Ramsay , Catherine Servis . Observations on the structure of the fungal extracellular polysaccharide , pullulan[J]. **Carbohydrate Research** , 1986 , 153 : 79 - 86 .

(责任编辑:李春丽)

(上接第 6 页)

[2] Gil J V ,Mateo J J ,Jimenez M , *et al.* . Aroma compounds in wine as influenced by apiculate yeast[J]. **J Food Sci** ,1996 ,61(6) : 1247 - 1249 ,1266 .
[3] Scherier P ,Drawert F ,Schmid M . Changes in the composition of neutral volatile components during the production of apple brandy[J].**J Sci Fd Agric** ,1978 ,29(8) : 728 - 736 .
[4] Noble A C . In Analysis of Foods and Beverages ,Headspace Techniques[M]. New York : Academic Press , 1978 . 203 - 208 .
[5] Stashenko H ,Macku C ,Shibamoto T . Monitoring volatile chemicals formed from must during yeast fermentation[J].**J Agric Food Chem** ,1992 ,40(11) : 2257 - 2259 .
[6] Soles K M ,Ough C S ,Kunkee R E . Ester concentration differences in wines fermented by various species and strains of yeasts [J].**Am J Enol Vitic** ,1982 ,33(1) : 94 - 98 .
[7] Mangas J J ,Gonzalez M P ,Rodriguez R , *et al.* . Solid-phase extraction and determination of trace aroma and flavour components in cider by GC-MS[J].**Chromatographia** ,1996 ,42(1/2) : 101 - 105 .
[8] Henryk H J ,Krystian W ,Erwin W , *et al.* . Solid-phase microextraction for the analysis of some alcohols and esters in beer : comparison with static headspace method[J]. **J Agric Food Chem** ,1998 ,46(4) : 1469 - 1473 .
[9] Alexandra S ,Janusz P . Analysis of flavor volatiles using headspace solid-phase microextraction[J]. **J Agric Food Chem** ,1996 ,44(8) : 2187 - 2193 .
[10] Elizabeth V ,Susan E E . Monitoring ester formation in grape juice fermentations using solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry[J]. **J Agric Food Chem** ,2001 ,49(2) : 589 - 595 .
[11] 徐岩.一种苹果酒酵母和用该酵母发酵酿制苹果酒的方法[P].中国专利 :1335392A ,2002-02-13 .
[12] Williams A A . Flavour research and the cider industry[J].**J Inst Brew** , 1974 ,80(5) : 455 - 470 .

(责任编辑:李春丽)