

# 葡聚糖产生菌 (*Leuoconostoc mesenteroides*) 发酵培养基优化初步研究\*

## On Dextran Optical Mediums of Flask Fermentation by *Leuoconostoc mesenteroides*

廖 威

Liao Wei

(广西职业技术学院 南宁明阳 530227)

(Guangxi Vocational Technology College, Mingyang, Nanning, 530227)

**摘要** 采用单一因素确定法研究分离自明阳糖厂的一株肠膜明串珠菌菌株摇瓶发酵生产葡聚糖的适宜培养基, 结果得到适宜培养基的组分为: 蔗糖 10%、酵母膏 0.4%、磷酸氢二铵 0.6%、磷酸二氢钾 0.1%、硫酸镁 0.1%、 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  0.0003%、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.0005%、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.005%、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.002%。

**关键词** 葡聚糖 培养基 肠膜明串珠菌

**中图分类号** Q93-335

**Abstract** By using the determination of single diathesis, the optical mediums of flask fermentation to dextran that separated from a strain of *Leuoconostoc mesenteroides* in Minyang Sugar-mill are obtained. It showed that the suitable mediums are: sucrose 10%,  $(NH_4)_2HPO_4$  0.6%,  $KH_2PO_4$  0.1%,  $MgSO_4$  0.1%, yeast extract 0.4%,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  0.0003%,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.0005%,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.005% and  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.002%.

**Key words** dextran, mediums, *Leuoconostoc mesenteroides*

葡聚糖是一种具有重要医用价值的产品, 有不少研究者致力于它的开发研究, 如代血浆、免疫抗癌、药物活性、临床使用、药用葡聚糖的结构等<sup>[1]</sup>。医药上葡聚糖应用的最初例子是作为人造血浆, 具有很高的水溶性。生产葡聚糖的方法较多, 有微生物发酵生产、酶催化合成和分解、从植物或真菌中提取或从酵母中制取, 以微生物发酵生产为佳<sup>[2]</sup>。葡聚糖的生产菌株一般为肠膜明串珠菌 (*Leuoconostoc mesenteroides*)、肠系膜状白捻珠菌 (*L. mesenteroides*)、聚糊精白念珠菌 (*L. dextruicicum*)、嗜柠檬酸白念珠菌 (*L. citrovorum*)、变异链球菌 (*Streptococcus mutans*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 中的某些乳杆菌及某些酵母菌属<sup>[3]</sup>。本试验

2003-03-05 收稿, 2003-04-10 修回。

\* 本文是作者于广西大学攻读硕士研究生期间所做课题的部分内容。

从明阳糖厂分离到一株产优质葡聚糖的肠膜明串珠菌菌株,可利用蔗糖生产代血浆原料葡聚糖,是提高蔗糖综合利用的方法之一。本文通过单因素对比实验初步确定该菌株发酵葡聚糖的适宜培养基。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试剂

本研究所用蔗糖、葡萄糖、酵母膏、碱性硫酸铜、硫酸、苯酚、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$ 等试剂均为分析纯或化学纯。

#### 1.1.2 实验仪器

超净工作台;PYX-DS-40X50隔水式电热恒温培养箱,上海跃进医疗器械厂;HQL300柜式恒温摇床,中科院武汉科学仪器厂;METTER天平;CS101-2型电热鼓风干燥箱,重庆试验设备厂;METTER TLEDO 320 pH METER;UV-vis765紫外分光光度计。

#### 1.1.3 菌种

肠膜明串珠菌,由广西大学食品发酵所从明阳糖厂分离得到。

#### 1.1.4 基本培养基

组分为(g/1000ml):酵母膏5;蔗糖50;  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1;  $\text{MgSO}_4$ 0.2; pH值自然。在本研究中依试验的需要而改变特定的测试组份。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 葡聚糖定量方法

采用苯酚-硫酸比色法<sup>[4]</sup>。

#### 1.2.2 酵母膏对葡聚糖产量的影响试验

在添加0.3%酵母膏的培养基和无酵母膏的培养基中分别接种;并逐步提高酵母膏浓度为:0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%。

#### 1.2.3 碳源浓度对葡聚糖产量的影响试验

在含有6%、8%、10%和12%蔗糖浓度的培养基中分别接种。

#### 1.2.4 氮源种类及氮源浓度对葡聚糖产量的影响试验

分别利用 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{KNO}_3$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 作为不同种类的氮源,以及 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 的含量为0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%和0.8%时对葡聚糖产量的影响,按10%的接种量接入种子液。

#### 1.2.5 磷酸二氢钾对葡聚糖产量的影响试验

磷酸二氢钾浓度分别为0.05%、0.10%、0.15%、0.20%和0.25%时在发酵培养基中接入10%的种子液。

#### 1.2.6 硫酸镁对葡聚糖产量的影响试验

分别在硫酸镁浓度为0.03%、0.05%、0.10%、0.15%和0.20%的发酵培养基中接入10%的种子液。

#### 1.2.7 微量元素对葡聚糖产量影响试验

采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法确定微量元素对葡聚糖产量的影响比例。正交试验设4个因素,每个因素设3个水平,详见表1。试验操作同上。

上述1.2.2~1.2.7实验中,发酵培养条件均为25℃,100 rpm培养26 h后,分别测定其葡聚糖产量。

2 结果与分析

表1 微量元素L<sub>1</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验设计

水平	MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O (A,%)	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (B,%)	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (C,%)	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O (D,%)
1	0.0001	0.0001	0.001	0.001
2	0.0002	0.0005	0.005	0.002
3	0.0003	0.0010	0.010	0.003

2.1 酵母膏对葡聚糖产量的影响

无酵母膏的培养基发酵培养得葡聚糖3.2 g/100 ml,加入0.1%酵母

膏的培养基发酵培养得到葡聚糖3.7 g/100 ml。表明向发酵培养基中加入适量浓度的酵母膏可以提高葡聚糖产量。从图1可知,酵母膏浓度为0.4%时,葡聚糖产量最高。

2.2 碳源浓度对葡聚糖产量的影响

从图2可见,蔗糖浓度为10%时葡聚糖的产量最高。本试验肠膜明串珠菌的碳源只使用蔗糖,但并不意味着只能利用蔗糖产生葡聚糖,也可以通过诱导作用利用其他碳源。

2.3 氮源浓度对葡聚糖产量的影响

从图3可以看出,发酵液中含有0.6%的磷酸氢二铵既可以供给菌体生长所必须的氮元素,又不至于抑制葡聚糖的产生。表2表明不同的氮源对菌株产葡聚糖能力的影响不同,以磷酸氢二铵为氮源时葡聚糖产量最高。

表2 不同氮源对产葡聚糖量的影响

氮源种类	含氮量 (%)	葡聚糖产量 (g/100ml)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	21.21	3.7
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	35.00	3.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	21.21	3.2
KNO <sub>3</sub>	13.86	3.5

2.4 磷酸二氢钾对葡聚糖产量的影响

由图4可见磷酸二氢钾浓度为0.1%时葡聚糖产量最高。

2.5 硫酸镁对葡聚糖产量的影响

从图5可知,硫酸镁对葡聚糖产量的影响不大,硫酸镁含量为0.1%时产葡聚糖量最高。

2.6 培养基中的微量元素对葡聚糖产量的影响

由表3分析可知,无机离子的适宜条件为: MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O 0.0003%; ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.0005%; FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.005%; CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.002%。

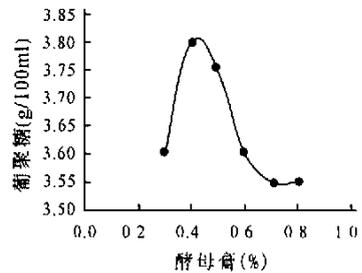


图1 酵母膏浓度对葡聚糖产量的影响

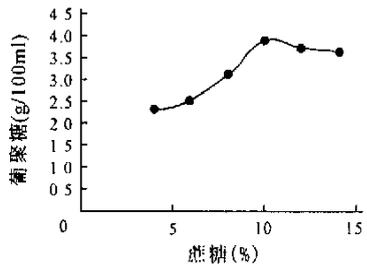


图2 蔗糖浓度对葡聚糖产量的影响

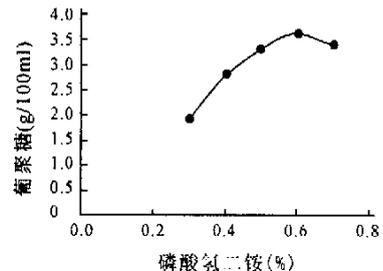


图3 磷酸氢二铵浓度对葡聚糖产量的影响

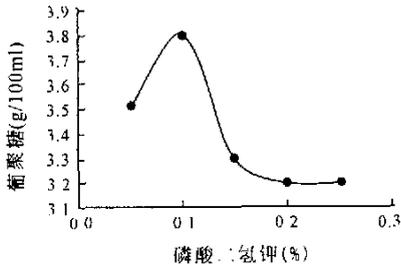


图4 磷酸二氢钾浓度对葡聚糖产量的影响

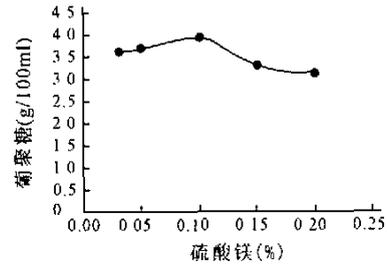


图5 硫酸镁浓度对葡聚糖产量的影响

表3 微量元素L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验结果

水平	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)	葡聚糖 (g/100ml)
1	0.0001	0.0001	0.001	0.001	3.2
2	0.0001	0.0005	0.005	0.002	3.8
3	0.0001	0.0010	0.010	0.003	3.0
4	0.0002	0.0001	0.005	0.003	2.9
5	0.0002	0.0005	0.010	0.001	3.3
6	0.0002	0.0010	0.001	0.002	3.5
7	0.0003	0.0001	0.010	0.002	3.6
8	0.0003	0.0005	0.001	0.003	3.4
9	0.0003	0.0010	0.005	0.001	3.5
k <sub>1</sub>	3.33	3.23	3.37	3.33	
k <sub>2</sub>	3.23	3.50	3.40	3.60	
k <sub>3</sub>	3.50	3.33	3.30	3.10	
Q	0.27	0.27	0.10	0.50	
最优化条件	A (3)	B (2)	C (2)	D (2)	

### 3 结束语

肠膜明串珠菌产葡聚糖的适宜摇瓶发酵培养基为：蔗糖 10%、酵母膏 0.4%、磷酸氢二铵 0.6%、磷酸二氢 0.1%、硫酸镁 0.1%、MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.0003%、ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.0005%、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.005%、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.002%。下一步试验将进行工业条件优化。

### 参考文献

- 1 王 森,丁霄霖. 葡聚糖生物活性与结构关系. 无锡轻工大学学报, 1997, 16(2): 90~95.
- 2 赵光远, 殷蔚申, 吴小荣. 用废啤酒酵母制备碱不溶性葡聚糖的研究. 微生物学通报, 1997, 24 (3): 148~152.
- 3 孙力军, 吴吉明. 肠膜明串珠菌的分离与鉴定. 安徽农业技术师范学院学报, 2000, 14(4): 22~25.
- 4 张惟杰. 复合多糖生化研究技术. 上海: 上海科学技术出版社, 1987. 6~7.

(责任编辑: 邓大玉 曾蔚茹)