

不同生长条件对酵母产多糖及降糖的影响

姜 威,张善飞,陈 杰,成建国,赵长新

(大连工业大学生物工程学院,辽宁 大连 116034)

摘 要: 在酵母生长过程中,pH值、碳源及溶氧条件是影响其分泌多糖和降糖效果的重要因素。研究结果表明,当培养基pH值为6.0时,酵母分泌多糖含量达到较高值5.22 mg/mL,降糖速度较快;碳源为果糖时,酵母多糖分泌最多达到5.40 mg/mL;溶氧条件对酵母分泌多糖影响最显著,在好氧和厌氧条件下酵母分泌多糖分别达到4.31 mg/mL和1.81 mg/mL。选择培养基为pH6.0,果糖为碳源且在好氧条件下,有利于酵母生长,降糖速度快,多糖产量高。

关键词: 微生物; 酵母多糖; 降糖; 酵母; 生长条件

中图分类号:TS261.1;TS261.4;TQ920

文献标识码:A

文章编号:1001-9286(2012)04-0050-03

Effects of Different Growth Conditions on Polysaccharides-producing and Glucose-reducing of Yeast

JIANG Wei, ZHANG Shanfei, CHEN Jie, CHENG Jianguo and ZHAO Changxin

(School of Bioengineering, Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning 116034, China)

Abstract: pH values, carbon source and dissolved oxygen conditions are key factors influencing polysaccharides-producing and glucose-reducing of yeast during yeast growth process. The research results suggested that as culture medium pH value was 6.0, the content of polysaccharides secreted by yeast was as high as 5.22 mg/mL and glucose-reducing speed was comparatively fast, as fructose was selected as carbon source, the content of polysaccharides secreted by yeast could achieve 5.40 mg/mL, and dissolved oxygen conditions had the most significant effects on polysaccharides-producing of yeast (the content of polysaccharides secreted by yeast reached up to 4.31 mg/mL in aerobic conditions and to 1.81 mg/mL in anaerobic conditions). As the best choice in practice, culture medium pH value should be 6.0, fructose selected as carbon source, and aerobic conditions selected, which were helpful for yeast growth with fast glucose-reducing speed and high polysaccharides yield.

Key words: microbe; polysaccharides-producing; glucose-reducing; yeast; growth conditions

多糖属于天然大分子化合物,是由醛糖或酮糖通过糖苷键连接在一起的多聚物,对调节细胞的各种生命活动有着重要作用。多糖具有广泛的药理学活性,如免疫调节作用、抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗衰老作用,有些多糖还具有抗放射损伤、抗癌及降血糖、降血脂等作用^[1]。

王洪斌^[2]等发现酵母多糖能够抑制邻苯三酚自氧化,具有较强的抗氧化能力;金淑英^[3]等发现酵母多糖对大肠杆菌致毒条件下的仔鸡的小肠粘膜也具有保护作用;高仕英^[4]等发现酵母多糖对小鼠和仔鸡的免疫功能也有一定促进作用。鉴于此,笔者通过不同pH值、碳源、碳源浓度、溶氧条件等对酵母产多糖及其降糖效果的影响进行研究和探讨,为该多糖的工业化发酵生产提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期:2011-10-13; 修回日期 2011-12-31

作者简介:姜威(1975-),男,辽宁辽阳人,硕士研究生,研究方向为酵母多糖的分离与纯化。

通讯作者:赵长新(1955-),男,教授,主要从事酿造大麦蛋白质组学及酵母代谢机理研究,Email:zhaochangxin@126.com。

1.1.1 菌种

实验菌种:FFC2144(*Saccharomyces cerevisiae*),由大连工业大学菌种保藏所提供。

1.1.2 培养基

试管斜面培养基:葡萄糖2.0%、马铃薯20%、琼脂2.0%;

种子培养基:葡萄糖2.0%、蛋白胨1.0%、硫酸铵1.5%、磷酸二氢钾0.25%;

发酵培养基:同种子培养基。

1.1.3 试剂和仪器

试剂:葡萄糖、果糖、蔗糖、蛋白胨、磷酸二氢钾、硫酸铵、氯仿、正丁醇、浓硫酸、苯酚等,均为分析纯。

仪器:ZHWHY-2102C恒温培养振荡器,上海智城分析仪器制造有限公司;压力蒸汽灭菌器,上海三申医疗器械有限公司;低速离心机,安徽中科中佳科学仪器有限公司;旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂;JA2003型电子天

平,上海精密科学仪器有限公司;WFJ7200 分光光度计,尤尼柯仪器有限公司;冷冻干燥机,日本 JEOL。

1.2 方法

1.2.1 酵母的培养

①在无菌环境下,从试管斜面中挑取 1~2 环接种到种子培养基中,以 30 °C、160 r/min 摇床培养 15 h。

②将种子液取出,在无菌条件下,以 1.0 %接种量接种到 500 mL 三角瓶中,在 30 °C 下于不同 pH 值、碳源、溶氧条件下培养一定时间,测定总糖量和还原糖量,考察不同培养条件对酵母产多糖和降糖效果的影响。

1.2.2 发酵液中还原糖和多糖的测定

还原糖的测定采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法进行测定^[5];总糖的测定采用苯酚-硫酸法进行测定^[6];多糖含量 = 总糖含量 - 还原糖含量。

1.2.3 酵母多糖的提取

将培养 3 d 后的发酵液以 4000 r/min 离心 20 min;取上清液通过旋转蒸发浓缩至原来体积的 1/4;向浓缩后的发酵液中加入 2.0 g 活性炭,于室温下放置 4 h 后常压过滤,取滤液,按上述操作重复 3 次,此时所得的发酵液澄清透明。

采用 sewage 法^[7]萃取 3 次以除去发酵液中的蛋白质等杂质;将上清液转移至 3500 Da 透析袋中进行透析,于 4 °C 过夜;然后向所得样品中加入无水乙醇($V_{\text{上清液}}:V_{\text{乙醇}}=1:3$),于 4 °C 过夜,使发酵液中的多糖完全沉淀;再以 4000 r/min 离心 20 min,弃上清液取沉淀,将沉淀物进行冷冻干燥并称重,干燥后的样品即为多糖粗品。

2 结果与讨论

2.1 不同 pH 值对酵母产多糖及其降糖效果的影响

选取不同 pH 值(3.0、4.0、5.0、6.0)的培养基培养酵母,测定多糖以及降糖的含量,结果见图 1 和图 2。

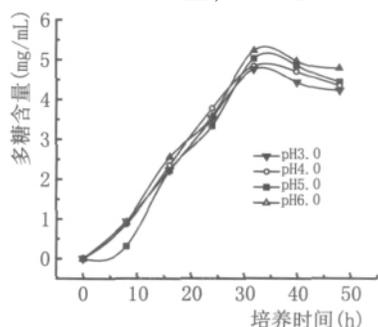


图 1 不同 pH 值对酵母产多糖的影响

酵母生长环境的 pH 值是影响酵母生长代谢的关键因素。由图 1 可知,pH 值对酵母产多糖有着显著的影响。在酵母培养前 30 h,不同 pH 值下的酵母多糖含量相差不大,四者的多糖含量都在增长。可能由于培养基内有足够的还原糖供酵母利用,使得酵母不会分解自身所分泌的多糖,所以多糖含量一直处于增长状态;30 h 后,

4 种酵母多糖含量都开始出现下降的趋势,并且 pH6.0 生长环境下的酵母多糖含量开始明显高于其他,在 30 h 达到 5.22 mg/mL,而 pH3.0、4.0、5.0 培养基中的酵母产多糖含量分别为 4.75 mg/mL、4.82 mg/mL、5.02 mg/mL。此时酵母进入稳定后期,培养基内的部分还原糖基本已被消耗,酵母利用自身的诱导机制产生部分水解酶来分解自身的多糖以满足自身的生命活动。所以,在 pH6.0 的生长环境下,培养 30~35 h 为提取酵母多糖的最佳时间。

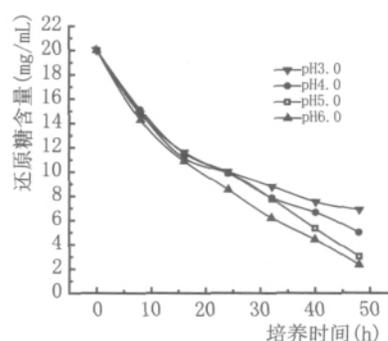


图 2 不同 pH 值对酵母降糖效果的影响

由图 2 可知,酵母的 pH 值环境对还原糖的降解速度有着很大的影响。在前 15 h,4 种 pH 值条件的酵母降糖速度基本一致;15 h 以后,pH6.0 的酵母降糖速率明显加快,在 24 h 达到 8.60 mg/mL,pH4.0 和 pH5.0 条件下的酵母在 32 h 即达到此浓度,而 pH3.0 的酵母在 40 h 才能达到。说明 pH6.0 的酵母生长良好,结合图 1 可知,酵母生长越好,分泌多糖就越多。

2.2 不同碳源对酵母产多糖及其降糖效果的影响

碳源泛指能在微生物生长过程中提供碳素的一类物质,菌体的各种生理活动均受碳源种类的影响。选取浓度为 2 % 的不同碳源(葡萄糖、果糖、蔗糖)培养酵母,测定多糖以及还原糖含量,结果见图 3 和图 4。

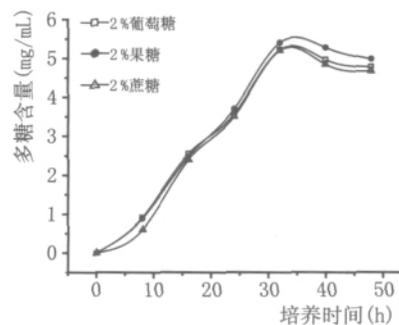


图 3 不同碳源对酵母产多糖的影响

由图 3 可知,在酵母培养前 30 h,3 种酵母的多糖增长速率基本一致,但以葡萄糖和果糖为碳源的酵母分泌的多糖含量略高于蔗糖。以果糖为碳源的酵母在 30 h 时,多糖含量达到最大值 5.40 mg/mL,而碳源是葡萄糖和蔗糖的酵母所得多糖含量分别达到 5.22 mg/mL 和 5.20 mg/mL。酵母对碳源物质具有选择性,糖类一般是容易利用的良好碳源和能源物质,但对不同糖类的利用也

有差别,并且糖类还直接参与多糖的合成^[8],所以对产生的多糖含量影响较大。

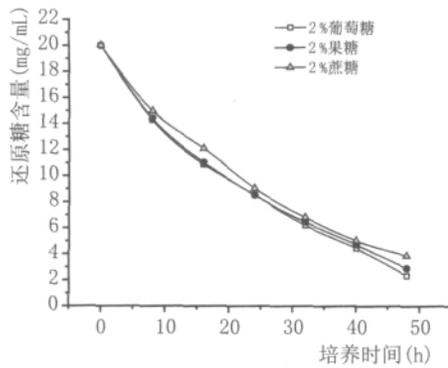


图4 不同碳源对酵母降糖的影响

由图4可知,酵母利用葡萄糖和果糖的速率明显高于蔗糖,所以利用果糖和葡萄糖为碳源的酵母生长较好。结合图3所示,果糖和葡萄糖为碳源时酵母分泌多糖较多的情况,说明酵母生长良好且多糖产量高,所以选择果糖为碳源培养酵母,在提取时间为30h时,提取多糖产量较高。

2.3 不同溶氧条件对酵母产多糖及其降糖效果的影响

选取转速为180 r/min(好氧)和静置(厌氧)2种培养方式培养酵母,测定多糖和还原糖含量,结果见图5和图6。

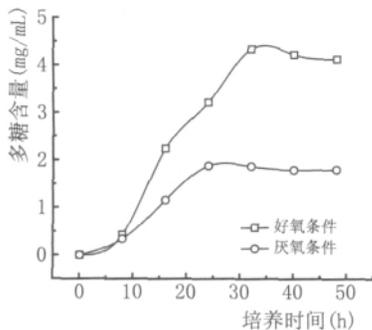


图5 不同溶氧条件对酵母产多糖的影响

酵母属于兼性厌氧微生物,由图5可知,溶氧条件对酵母产多糖的影响较大。厌氧条件下,酵母在24h以后多糖含量基本处于稳定状态,多糖含量维持在1.81 mg/mL左右;好氧条件下,酵母多糖含量升高速率较快,在30h时达到最大值4.31 mg/mL。

由图6可知,溶氧条件对酵母降糖影响也比较显著。好氧条件下的酵母降糖速率明显高于厌氧条件。好氧条件有利于酵母的生长,菌体浓度升高,降糖速度明显加快,多糖的分泌量也相应加大。所以酵母的生长与多糖分泌成正相关,选择好氧条件培养酵母有利于多糖的分泌,并且在30h时多糖含量达到最大值。

2.4 不同条件对酵母产多糖干重的影响

对不同条件下培养的发酵液中的多糖进行提取,结果见图7。

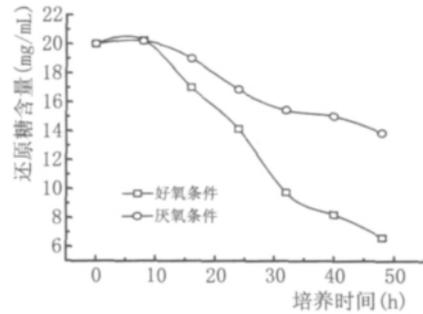


图6 不同溶氧条件对酵母降糖的影响

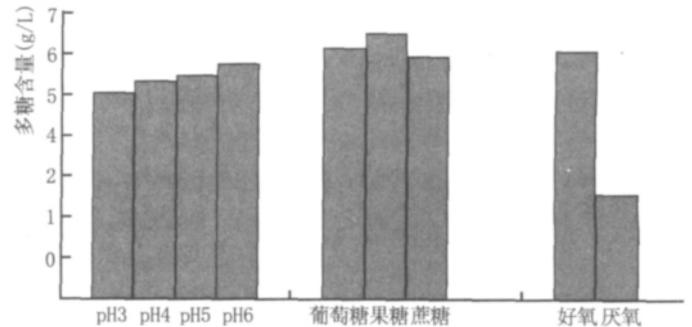


图7 不同生长条件下酵母多糖含量比较

培养基的pH值对多糖含量有一定的影响,当pH值为6.0时,多糖含量达到最大,为5.76 mg/mL;碳源对多糖含量的影响较为明显,当碳源为果糖时,多糖含量比葡萄糖和蔗糖含量高,达到6.50 mg/mL;溶氧条件对多糖含量影响最为显著,好氧条件下多糖含量是厌氧条件的2.4倍。

3 结论

通过不同培养基pH值、不同碳源以及不同溶氧条件等单因素实验对酵母分泌多糖和降糖效果进行研究,结果表明,当在pH值为6.0、碳源为果糖、好氧条件等生长条件下,酵母生长较好,降糖速度较快,产多糖较多。

参考文献:

- [1] 何朝勇,王立为.多糖的免疫调节作用综述[J].安徽中医学院学报,2002,21(4):62-64.
- [2] 王洪斌,朱强,阎斌伦,等.红酵母多糖的提取、化学组成及抗氧化性的鉴定[J].中国酿造,2009(11):34-36.
- [3] 金淑英,李斯华,黄挺进.酵母多糖对断奶仔猪抗病促长作用的试验研究[J].浙江畜牧兽医,2001(3):3-4.
- [4] 高仕英,吴纪经,吴英华.酵母多糖对肉用仔鸡免疫系统的影响[J].中国实验动物学报,2000,8(3):187-189.
- [5] 张水华.食品分析[M].北京:中国轻工业出版社,2004.
- [6] 张惟杰.复合多糖生化研究技术[M].上海:上海科学技术出版社,1987.
- [7] 李知敏,王伯初,周菁,等.植物多糖提取液的几种脱蛋白方法的比较分析[J].重庆大学学报,2004(8):57-59.
- [8] 张勇,吴周和,周丽明.酵母多糖产生菌的筛选和发酵条件的研究[J].中国酿造,2005(8):17-19.