

酵母细胞转运正烷烃的研究

II. 糖类对突变菌株 U_{3-21} 的生长、乳化剂和二羧酸产生的影响

陈远童 郝秀珍

(中国科学院微生物研究所, 北京)

以不同碳链的正烷烃作为唯一生长碳源时, U_{3-21} 菌株产生乳化剂的量不同, 因而菌体生长也不同, 产生乳化剂多的, 菌体生长也好^[1]。本文主要报道在烷烃发酵中, 糖类对菌株产生乳化剂的促进与抑制作用, 0.15% 的蔗糖, 大大促进了乳化剂的产生, 加速菌体生长, 提高二羧酸的产量。发酵培养基初始 pH 不同, 也影响菌体生长和二羧酸产量。

材料与 方法

(一) 菌种

突变菌株 U_{3-21} ^[2]

(二) 试剂

长链混合正烷烃 ($C_{10}-C_{19}$), 锦西石油化工五厂出品; 200# 轻油 ($C_{10}-C_{14}$), 北京东方红炼油厂出品; 正十六烷, 化学纯。

(三) 培养基

1. 种子培养基(%): A、10 个波林的麦芽汁; B、 KH_2PO_4 0.8, 玉米浆 0.3, 酵母膏 0.3, 蔗糖 0.3, 尿素 0.3, $C_{10}-C_{19}$ 长链混合正烷烃 4.0, 自然 pH, 20ml 培养基/250ml 三角瓶。

2. 发酵培养基(%): C、 KH_2PO_4 0.8, NaCl 0.1, 玉米浆 0.03, 酵母膏 0.1, 尿素 0.1, $C_{10}-C_{19}$ 长链混合正烷烃 2.0, 200 号轻油 12.0 或正十六烷 5—10, 调 pH 至 7.5, 20ml 培养基/500 ml 三角瓶。

D、 KH_2PO_4 0.8, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05, 玉米浆 0.15, 酵母膏 0.25, 尿素 0.2, 正十六烷 3.0, 自然 pH。

B、C、D 培养基均为 8 磅蒸汽灭菌 30 分

钟, 尿素和正烷烃分开灭菌, 接种时分别加入。

(四) 培养条件

将在大管 (18×195 mm) 麦芽汁斜面上 $28^\circ C$ 培养两天的 U_{3-21} 菌种一管, 接入装有 25 ml 10 个波林的麦芽汁培养基的 250ml 三角瓶中, 在旋转式摇床 (200rpm) 上, $28^\circ C$ 培养 24 小时, 无菌离心去上清液, 菌体用无菌水洗一次, 离心去上清液, 用无菌水配成菌悬液, 以 4% (V/V) 的种量将此菌悬液接入培养基 D 中, 在上述条件下培养两天, 测定菌体生长和乳化剂。

(五) 菌体量的测定

方法见前报^[1]。

(六) 乳化剂的测定

方法见前报^[1]。

(七) 二羧酸的提取与测定

取一定量的发酵液, 用 6N HCl 酸化至 pH 2 左右, 用乙醚提取, 去乙醚得白色晶体, 将晶体溶解于 95% 的热乙醇中, 以 NaOH 溶液滴定, 混合二羧酸的产量按十二-二羧酸的分子量计算。

试验 结果

(一) 发酵培养基初始 pH 对 U_{3-21} 生长和二羧酸产量的影响

在配发酵培养基 C 时, 灭菌前, 把 pH 分别调到 5.5 (自然 pH), 6.5, 7.0, 7.5 和 8.0。把在 $28^\circ C$ 培养两天的 U_{3-21} 大管麦芽汁斜面菌种

感谢方心芳教授对本工作的指导。

一管，接入种子培养基 B 中，培养 40 小时作为种子。于上述不同初始 pH 的培养基中，分别加入 12% 200 号轻油，2% C₁₀—C₁₉ 的长链混合正烷烃，0.1% 尿素，接种量 10% (V/V)，在 200rpm 的旋转摇床上发酵 4 天。从 24 小时起每天用 6N NaOH 调一次 pH 至 7.5—8.0，在 24 和 48 小时取样测定菌体 OD 值，发酵 96 小时，测定二羧酸(图 1)。结果表明，灭菌前调 pH 到 7.5 时，菌体生长较好，二羧酸产量比不调时高。据此，以后的试验，灭菌前都把 pH 调到 7.5。

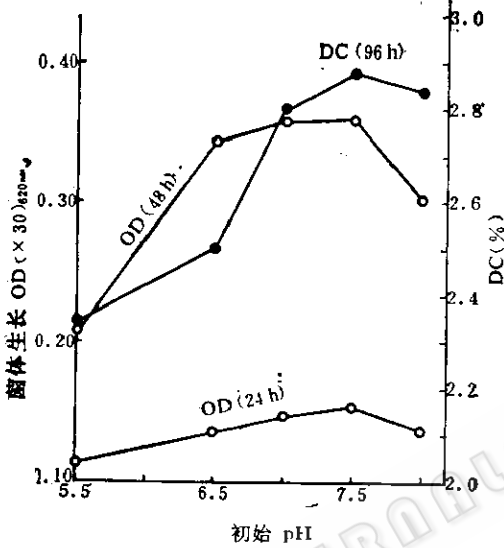


图 1 发酵培养基初始 pH 对酵母生长和二羧酸产量的影响
* DC: 二羧酸; OD: 光密度

(二) 糖类对乳化剂产生的促进与抑制

1. 几种糖对 U₃₋₂₁ 菌产生乳化剂的影响

在培养基 D 中，分别加入 0.15% 的麦芽糖、葡萄糖、蔗糖和果糖，和不加任何糖的空白对照，培养两天后，测定菌体和乳化剂(图 2)。结果表明，蔗糖明显地促进乳化剂的产生，而葡萄糖和果糖则对乳化剂的产生稍有抑制。

2. 蔗糖浓度对 U₃₋₂₁ 菌产生乳化剂的影响

在培养基 D 中，分别加入(%)0.05, 0.10, 0.15, 0.20 和 0.25 的蔗糖，并做空白对照，培养 40 小时，测定菌体和乳化剂，结果表明(图 3)，0.15% 的蔗糖浓度最有利于乳化剂的产生。

3. 蔗糖与乳化剂、菌体生长和二羧酸的关系

比较了在发酵培养基 C 中不加和加入

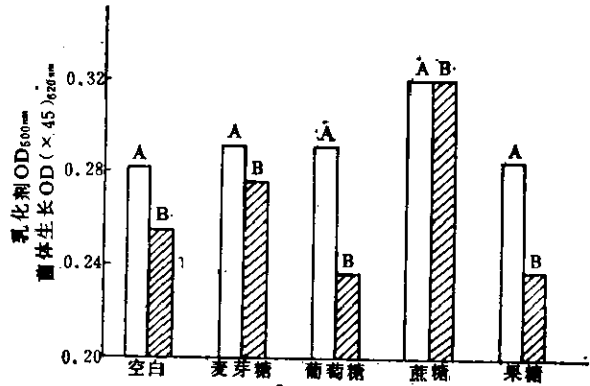


图 2 几种糖对 U₃₋₂₁ 菌株产生乳化剂的影响
A: 菌体生长 OD; B: 乳化剂 OD

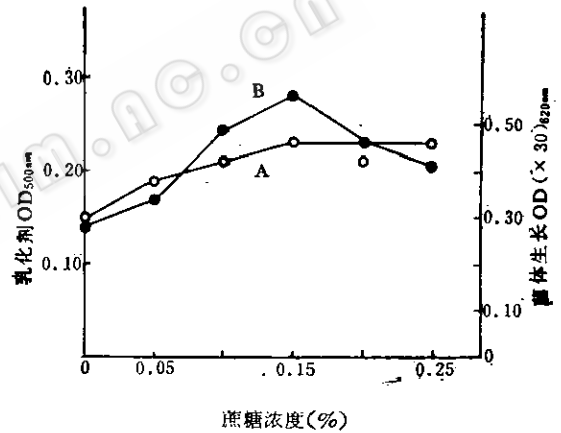


图 3 蔗糖浓度对 U₃₋₂₁ 菌株产生乳化剂的影响
A: 菌体生长 OD; B: 乳化剂 OD

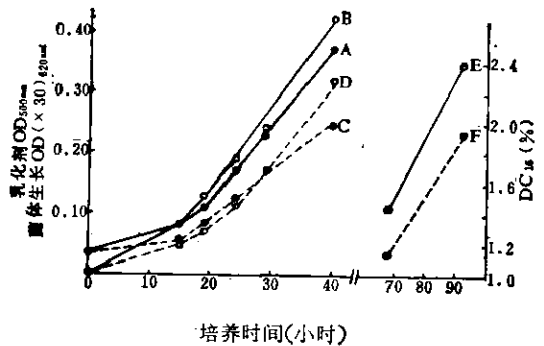


图 4 蔗糖对 U₃₋₂₁ 菌体生长及乳化剂和二羧酸产生的关系
A: 加蔗糖时菌体生长 OD; B: 加蔗糖时乳化剂 OD;
C: 不加蔗糖时菌体生长 OD; D: 不加蔗糖时乳化剂 OD; E: 加蔗糖时 DC₁₈; F: 不加蔗糖时 DC₁₈

0.15% 蔗糖，两天内乳化剂及菌体生长的变化情况及 4 天内产酸情况。接入 5% (V/V) 种子量，培养不同时间，取样测定乳化剂和菌体量；24 小时起，把 pH 调至 7.5，以后每 24 小时调一次 pH 至 8.0。发酵 3 天和 4 天，取样测定产酸量(图 4)。结果表明，加入 0.15% 蔗糖时，促进了乳化剂的产生，加速菌体生长，因而提高了二羧酸的产量。

讨 论

发酵培养基的初始 pH 调至 7.5 时，菌体生长较好，发酵 4 天，二羧酸产量比不调时高 20% 左右，概为磷酸盐缓冲所致。试验表明，在 24

小时内，培养基的 pH 逐渐趋向菌体生长的最适 pH^{5[3]}，而不用 NaOH 先调 pH 时，则低于生长最适 pH，因而生长不好，影响二羧酸产量。

同时，试验表明，单糖如葡萄糖和果糖，抑制乳化剂产生，而双糖如蔗糖和麦芽糖则促进乳化剂产生。其作用机理有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 陈远童等：微生物学通报 11(2)：61—64，1984。
- [2] 中国科学院微生物研究所烃代谢组：微生物学报，20(1)：88—93，1980。
- [3] 中国科学院微生物研究所烃代谢组、发酵车间：微生物学通报，7(1)：13—17，1980。