

热凝胶多糖产生菌株的复合诱变选育

付雅欣¹, 雷高², 方青², 高红亮³, 杨雪霞^{1*}

(1. 东华大学化学化工与生物工程学院, 上海 201620; 2. 上海东圣食品科技有限公司, 上海 200333; 3. 华东师范大学生命科学学院, 上海 200241)

摘要 [目的]提高热凝胶多糖产量和凝胶特性。[方法]采用紫外线和亚硝基胍对土壤杆菌 714 进行诱变;通过平板-摇瓶筛选方法,得到 2 株高产菌。[结果]突变菌株 0.6-45 和 0.5-50 的热凝胶多糖粗提得率分别为 26.5 和 26.4 g/L,分别是出发菌株粗提得率(3.8 g/L)的 7.0 和 6.9 倍,热凝胶多糖精提得率分别为 19.4 和 18.0 g/L。凝胶特性分析表明,突变菌株热凝胶多糖凝胶的破裂强度、破裂位移、弹性、内聚性、恢复性较好,均高于市售样品,而凝胶强度、硬度、胶着性和咀嚼性低于市售样品。GPC 测定菌株 0.6-45 和菌株 0.5-50 产热凝胶多糖的 M_w 分别为 1.57×10^6 和 1.27×10^6 Da。[结论]复合诱变提高了热凝胶多糖的产量并改善了多糖的凝胶特性。

关键词 热凝胶多糖;紫外诱变;亚硝基胍诱变;高产菌株;凝胶特性

中图分类号 Q93 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)11-0007-04

Mutation and Screening of Curdlan-producing Strain by Combined Mutation Methods

FU Ya-xin¹, LEI Gao², FANG Qing², YANG Xue-xia^{1*} et al (1. College of Chemistry, Chemical Engineering and Biotechnology, Donghua University, Shanghai 201620; 2. Shanghai Dongsheng Food Co. Ltd, Shanghai 200333)

Abstract [Objective] In order to improve the yield and quality of curdlan. [Method] *Agrobacterium* sp. 714 was mutated by UV and NTG. Two high-yield strains were selected by plate spreading and shaking-flask fermentation. [Result] The crude yield of curdlan from the strain 0.6-45 and strain 0.5-50 were 26.4 and 26.5 g/L, and were 6.9 and 7.0 times higher than the crude yield of parent strain (3.8 g/L). The refined yield of curdlan from the strain 0.6-45 and strain 0.5-50 were 19.4 and 18.0 g/L. The characteristics of gel showed that the fracture strength, fracture distance, springiness, cohesiveness and resilience were higher than the sample from market, and the gel strength, hardness, gumminess and chewiness were lower than sample from market. GPC results showed the molecular weights were respectively 1.57×10^6 and 1.27×10^6 Da for curdlan from the strain 0.6-45 and 0.5-50. [Conclusion] Combined mutation improves the yield of curdlan and changes the characteristics of gel.

Key words Curdlan; UV mutation; NTG mutation; High-yield strain; Gel characteristics

热凝胶多糖又称可得然胶,是一种主要由土壤杆菌类微生物产生的胞外 β -1,3-葡聚糖^[1-3],因其在加热条件下可以形成凝胶的独特性质而得名^[4]。热凝胶多糖最早是在 1966 年被 Harada 等^[5]发现并开始研究,1996 年被美国 FDA (Food and Drug Administration) 认证安全,可用作食品添加剂^[6]。热凝胶多糖具有独特的加热成胶性^[7]、良好的持水性^[8]、冻融稳定性^[9]和安全性^[6]等优良特性,近年来研究还发现其具有增强免疫和抗肿瘤的特性^[10],在食品^[11-12]、生物医药^[13-15]等领域具有广阔的应用前景。

为提高热凝胶多糖的产量,降低生产成本,国内外研究人员多采用优化发酵工艺提高热凝胶多糖的产量。West^[16]对菌株进行了诱变并结合培养基优化提高多糖的产量;Lee 等^[17]通过热凝胶多糖发酵中 pH 控制策略提高多糖产量;Lawford 等^[18]从反应器设计方面提高多糖的发酵产量;国内自 20 世纪 90 年代开始进行热凝胶多糖的研究^[19],詹晓北等主要从发酵工艺^[20-21]和生物反应器^[22]方面提高多糖的产量。少数研究者通过菌种改造提高热凝胶多糖产量,Kim 等^[23]对一株土壤杆菌进行亚硝基胍诱变,显著提高了产量,刘楠^[24]利用紫外诱变和李卫旗等^[25]利用⁶⁰Co γ -射线诱变对菌株进行选育,山东省食品发酵工业研究设计院对从土壤中分离出的产热凝胶多糖菌株进行性能研究和发酵优化并已投入工业生产^[26],但目前产品的产量和质量水平仍然无

法满足市场需求。热凝胶多糖作为一种食品凝胶应用时,不仅需要高的产量更需要好的凝胶特性,但目前为止,国内外对热凝胶多糖的研究主要集中于提高产量,而很少关注热凝胶多糖的凝胶特性。笔者以实验室保存的一株土壤杆菌为出发菌,分别对其进行了紫外诱变和亚硝基胍诱变,利用不同诱变剂间的协同效应,既提高了热凝胶多糖的产量又改善了其凝胶特性,旨在为热凝胶多糖的工业化生产和应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株。土壤杆菌(*Agrobacterium* sp.) 714,由东华大学化学化工与生物工程学院实验室保存。

1.1.2 培养基。斜面培养基:葡萄糖 10.00 g/L,牛肉膏 3.00 g/L,蛋白胨 5.00 g/L,NaCl 5.00 g/L,玉米浆 1.50 g/L,琼脂 15.00 g/L, pH 7.0。种子培养基:葡萄糖 20.00 g/L, (NH₄)₂HPO₄ 5.00 g/L,玉米浆 1.50 g/L, KH₂PO₄ 1.50 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 1.00 g/L, pH 7.0。平板筛选培养基:葡萄糖 70.00 g/L, 酵母提取物 4.00 g/L, 苯胺蓝 0.05 g/L, 琼脂 15.00 g/L, pH 7.0。发酵培养基:葡萄糖 50.00 g/L, 玉米浆 2.00 g/L, (NH₄)₂HPO₄ 2.00 g/L, KH₂PO₄ 2.00 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 1.00 g/L, CaCO₃ 2.00 g/L, pH 7.0。

1.2 方法

1.2.1 菌悬液制备及菌落单位计数。从斜面挑取一环菌落接入 50 mL 种子培养基,250 r/min、30 ℃ 振荡培养 20 h。取培养液 4 000 r/min 离心 5 min,去上清,沉淀中加入与上清等

基金项目 上海市自然科学基金项目(15ZR1401000)。
作者简介 付雅欣(1991—),女,河南济源人,硕士研究生,研究方向:工业微生物。*通讯作者,副教授,从事工业微生物研究。
收稿日期 2017-02-22

体积生理盐水,振荡重悬制成菌悬液,稀释 10^N 倍,取0.1 mL涂布于苯胺蓝平板,30℃培养2~3 d,进行计数,平板上平均菌落数记为A,则该菌悬液密度(CFU/mL)= $A \times 10^N + 1$ 。

1.2.2 紫外诱变。取900 μ L菌悬液(1×10^8 CFU/mL)于60 mm细胞板中,进行不同时间的紫外照射,紫外灯功率为15 W,待处理菌液与紫外灯距离为30 cm。

1.2.3 亚硝基胍诱变。称取0.01 g亚硝基胍溶于1 mL丙酮,加9 mL去离子水,制成1 mg/mL亚硝基胍溶液,过滤除菌,现配现用。分别取1 mL菌悬液加入50 mL锥形瓶中,加入不同体积的亚硝基胍母液及PBS缓冲液,使反应体系中菌液的OD₆₀₀为0.6,30℃振荡处理30 min,再用生理盐水洗3次终止诱变反应,稀释涂布于苯胺蓝平板。

1.2.4 致死率计算。诱变后菌液的活菌数为CFU₁,未处理菌液的活菌数为CFU₂,计算致死率。

1.2.5 突变菌株的筛选。平板筛选:待诱变菌液涂布于筛选平板上,挑选平板上菌落较大、显色较早或显色较深的菌落。摇瓶发酵筛选参考文献[27]。

1.2.6 热凝胶多糖得率测定。包括粗提得率和精提得率测定^[27]。

1.2.7 凝胶的质构分析。2%热凝胶多糖的凝胶强度测定参考国标(GB 28304—2012)方法^[28]。6%热凝胶多糖的TPA分析:称取0.9 g样品于15 mL蒸馏水中,用高速匀浆机在4 000 r/min转速下分散5 min,将悬液置于95℃水浴加热10 min,取出后在冷水中冷却,用压缩法测TPA。测定条件:Texture Analyser TA XT plus,p/50的不锈钢圆柱探头,测前速度1 mm/s,测中速度1 mm/s,测后速度1 mm/s,时间5 s,形变量75%,感应力5 g。

1.2.8 GPC测热凝胶多糖的分子量。使用Viscotek GPCmax及Viscotek TDA检测(英国,马尔文仪器有限公司),样品溶于DMSO,100℃水浴4 h助溶;测定柱温5℃,流动相DMSO(美国天地,色谱纯),流速0.5 mL/min,进样体积100 μ L。

2 结果与分析

2.1 土壤杆菌714的紫外诱变与突变菌株筛选 出发菌株714是一株产大量水溶性多糖而产少量热凝胶多糖的菌株。为提高该菌株的热凝胶多糖产量,先对该菌株进行紫外诱变。紫外照射时间与致死率的关系见图1。当紫外照射时间为10 s时,致死率较低,在50%~60%。随着诱变时间的延长,致死率逐渐上升。照射时间为20 s时,致死率在90%左右。当照射时间为30 s时,致死率接近100%。试验选择15和25 s 2个诱变剂量进行紫外诱变。

诱变后的菌液稀释涂布于苯胺蓝平板上,挑选显色较早、较深且表面较干的菌落。经过多批紫外诱变试验,共挑选出35株形态正突变菌,将其接种摇瓶进一步发酵筛选。取发酵液95℃加热10 min,发现其中14株菌发酵液可以形成凝胶,对这14株菌的发酵液进行热凝胶多糖粗提并计算粗提得率,结果如图2所示。

将摇瓶发酵初筛粗提得率较高的前5株菌株再次接摇瓶发酵复筛,发酵液热凝胶多糖粗提得率如图3所示,出发

菌株的热凝胶多糖粗提得率为3.8 g/L,突变菌株25-19-2的粗提得率为18.8 g/L,为出发菌株的热凝胶多糖粗提得率的4.9倍。菌株25-19-2用作后续亚硝基胍诱变的出发菌株。

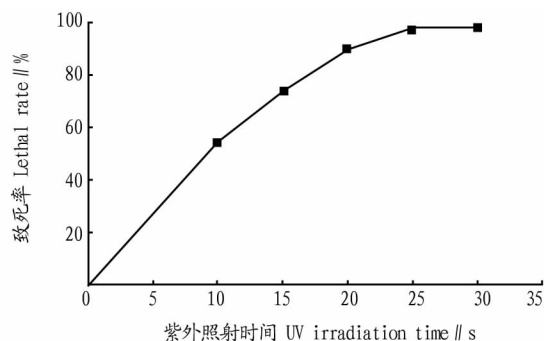


图1 紫外照射时间与菌体致死率之间的关系

Fig. 1 The relation between UV irradiation time and lethal rate

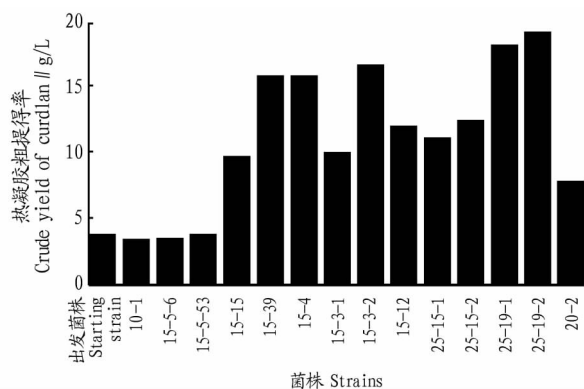


图2 紫外诱变摇瓶发酵初筛结果

Fig. 2 The result of primary screen by shaking-flask fermentation in UV mutation

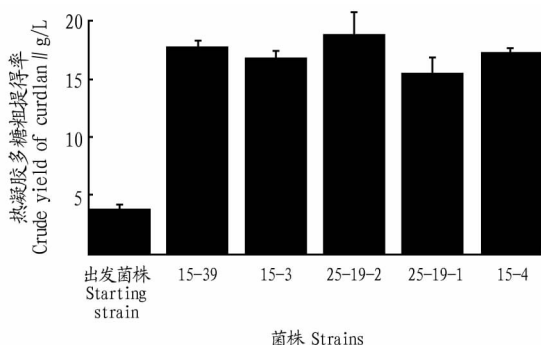


图3 紫外诱变摇瓶发酵复筛结果

Fig. 3 The result of secondary screen by shaking-flask fermentation in UV mutation

2.2 菌株25-19-2的亚硝基胍诱变及突变菌株筛选 在紫外诱变的基础上,以紫外诱变获得的高产菌株25-19-2为出发菌株,进行亚硝基胍诱变。首先考察了亚硝基胍浓度与致死率之间的关系,诱变处理时间为30 min,结果如图4所示,致死率随亚硝基胍浓度升高而升高。当亚硝基胍浓度为0.1 mg/mL时,致死率较低为66.73%;亚硝基胍浓度为0.4 mg/mL时,致死率较高为91.70%;当亚硝基胍浓度为0.6 mg/mL时,致死率已接近100%。

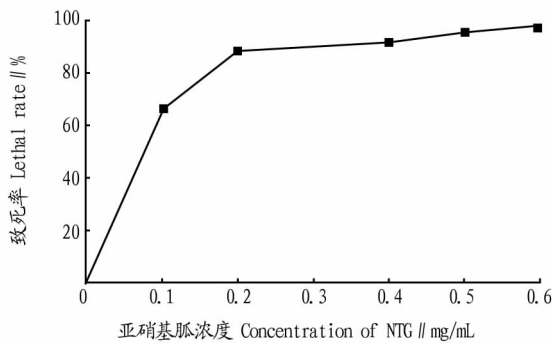


图4 亚硝基胍浓度与致死率之间的关系

Fig.4 The relation between concentration of NTG and lethal rate

在不同剂量下对菌株 25-19-2 进行了多轮亚硝基胍诱变,在苯胺蓝平板上共挑选出 344 株形态正突变菌,经摇瓶发酵初筛,诱变菌株的热凝胶多糖粗提得率在各剂量下分布如图 5 所示。当亚硝基胍浓度低于 0.1 mg/mL 的低剂量下,所挑选突变菌株热凝胶多糖粗提得率没有显著提高,而在较高剂量下,即亚硝基胍浓度大于 0.5 mg/mL 时,所选突变菌株的热凝胶多糖得率提高较多,即更有可能筛得高产菌株。

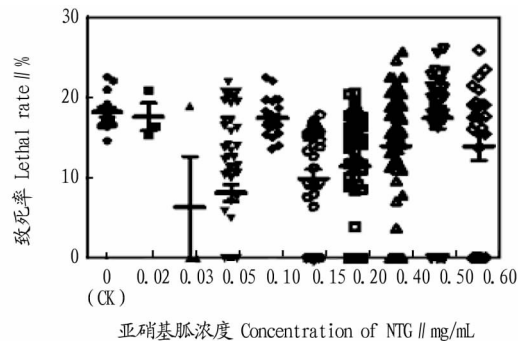


图5 平板筛选菌株的热凝胶多糖得率分布

Fig.5 The curdlan yield distribution of strains selected by selected by plate spreading

选取摇瓶初筛中粗提得率较高且比对照高 10% 的 19 株菌再次接摇瓶发酵复筛,发酵液热凝胶多糖得率结果如图 6 所示。最终筛选出 2 株高产菌 0.5-50 和 0.6-45,热凝胶多糖的粗提得率分别为 26.5 和 26.4 g/L,为出发菌株 714 粗提得率(3.8 g/L)的 6.9 和 7.0 倍。菌株 0.6-45 和菌株 0.5-50 的热凝胶多糖精提得率为 19.4 和 18.0 g/L,表明尽管热凝胶多糖的粗提得率相近,但菌株 0.6-45 的精提得率较高,说明菌株 0.6-45 产热凝胶多糖的能力更强。

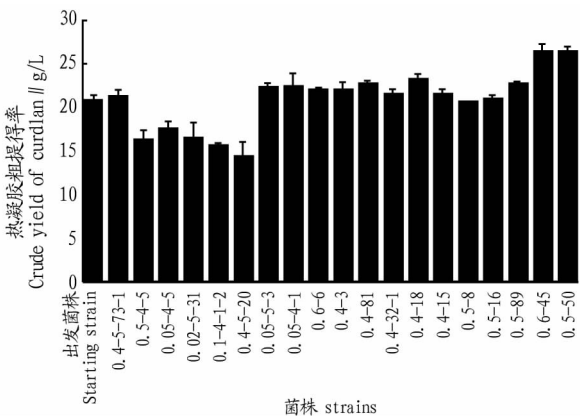


图6 亚硝基胍诱变初筛高产菌株的摇瓶复筛

Fig.6 The result of secondary screen by shaking-flask fermentation in NTG mutation

2.3 凝胶特性分析 以市售的进口热凝胶多糖样品为对照,对诱变所得高产菌株 0.6-45 和 0.5-50 的热凝胶多糖凝胶性能进行测定,结果见表 1。市售样品的凝胶强度为 483.784 g/cm²,菌株 0.6-45 和菌株 0.5-50 的热凝胶多糖的凝胶强度偏低,分别为 359.115 和 326.241 g/cm²,而突变菌株热凝胶多糖的凝胶破裂强度和破裂位移均高于市售样品,表明凝胶的韧性好于市售样品。

表1 2%热凝胶多糖凝胶力学性能分析

Table 1 The mechanical property of 2% curdlan gel

样品 Samples	凝胶强度 Strength g/cm ²	破裂强度 Rupture strength g/cm ²	破裂位移 Rupture displacement//mm
市售样品 Commercial sample	483.784	1 087.483	7.984
0.5-50	326.241	1 086.375	9.903
0.6-45	359.115	1 204.890	9.876

凝胶的 TPA 分析结果见表 2,诱变菌株多糖样品凝胶的硬度、胶着性和咀嚼性都低于市售样品,而弹性、内聚性、恢复性都高于市售样品,表明诱变菌株所产热凝胶多糖样品相比于市售样品更韧、弹性更大,这与凝胶的破裂位移较大是一致的。

2.4 突变菌株热凝胶多糖分子量 诱变菌株 0.6-45、0.5-50 所产热凝胶多糖精提样品的 GPC 分析结果见表 3。菌株 0.5-50 多糖的 M_w 在 1.27×10^6 Da 左右,菌株 0.6-45 多糖的 M_w 在 1.57×10^6 Da 左右,2 株菌所产热凝胶多糖的分子量均大于市售样品多糖。结合上述测定的凝胶特性可以看出,多糖分子量小时所形成的凝胶偏韧。

表2 6%热凝胶多糖凝胶样品 TPA 分析

Table 2 The result of TPA of 6% curdlan gel

样品 Samples	硬度 Hardness//g	弹性 Springiness	内聚性 Cohesiveness	胶着性 Gumminess	咀嚼度 Chewiness	恢复性 Resilience
市售样品 Commercial sample	4 334.638	0.764	0.642	2 750.791	2 115.516	0.359
0.5-50	3 506.353	0.791	0.714	2 521.805	1 980.922	0.436
0.6-45	3 422.234	0.804	0.712	2 385.689	1 875.196	0.427

表3 突变菌株热凝胶多糖分子量

Table 3 The molecular weight of curdlan of high-yield strains

样品 Sample	$M_n // \times 10^6$ Da	$M_w // \times 10^6$ Da	M_w/M_n
市售样品 Commercial sample	0.96	1.19	1.24
0.6-45	1.44	1.57	1.08
0.5-50	1.01	1.27	1.26

3 结论与讨论

该研究首次在筛选菌株时不仅考察热凝胶多糖的产量而且测定多糖的凝胶特性,采用紫外诱变结合亚硝基胍诱变以及平板筛选-摇瓶初筛-摇瓶复筛的筛选体系,筛得2株热凝胶多糖高产菌0.6-45和0.5-50。菌株0.6-45和0.5-50的热凝胶多糖粗提得率分别为26.5和26.4 g/L,分别是出发菌株714(3.8 g/L)的7.0和6.9倍。2株高产菌产热凝胶多糖的凝胶特性差异不大,所产热凝胶多糖的 M_w 分别为 1.57×10^6 和 1.27×10^6 Da,凝胶强度均略低于市售样品,但比市售样品凝胶更韧、弹性更大,可利用这个性质将该多糖用于需要一定韧性和弹性的产品中,为热凝胶多糖的工业化生产和应用奠定基础,同时可看出热凝胶多糖的产量和凝胶特性间没有相关性,因此,菌株的诱变筛选中应结合产量和凝胶特性综合评价菌株的特性。

参考文献

- [1] SHIH I L, YU J Y, HSIEH C, et al. Production and characterization of curdlan by *Agrobacterium* sp. [J]. Biochemical engineering journal, 2009, 43(1): 33-40.
- [2] 朱思明, 于淑娟, 杨连生, 等. 热凝胶多糖及其衍生物的结构与功能研究进展[J]. 现代食品科技, 2004, 20(Z1): 78-81.
- [3] ZHANG R R, EDGAR K J. Properties, chemistry, and applications of the bioactive polysaccharide curdlan [J]. Biomacromolecules, 2014, 15(4): 1079-1096.
- [4] 李明源, 王继莲, 魏云林, 等. 细菌胞外多糖的特性及应用研究[J]. 生物技术通报, 2014(6): 51-56.
- [5] HARADA T, MASADA M, FUJIMORI K, et al. Production of a firm, resilient gel-forming polysaccharide by a mutant of *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* 10C3[J]. Agricultural & biological chemistry, 1966, 30(2): 196-198.
- [6] DEMLEITNER S, KRAUS J, FRANZ G. Synthesis and antitumour activity of sulfoalkyl derivatives of curdlan and lichenan [J]. Carbohydrate research, 1992, 226(2): 247-252.
- [7] MAEDA I, SAITO H, MASADA M, et al. Properties of gels formed by heat treatment of curdlan, a bacterial β -1,3 glucan [J]. Agricultural and biological chemistry, 1967, 31(10): 1184-1188.

- [8] WILLIAMS P D, SADAR L N, LO Y M. Texture stability of hydrogel complex containing curdlan gum over multiple freeze-thaw cycles [J]. Journal of food processing & preservation, 2009, 33(1): 126-139.
- [9] TAKAHASHI F, HARADA T. Resistance of curdlan gel against freeze-thawing [J]. Journal of home economics of Japan, 1986, 37(4): 251-256.
- [10] YOSHIDA T, HATANAKA K, URYU T, et al. Synthesis and structural analysis of curdlan sulfate with a potent inhibitory effect *in vitro* of AIDS virus infection [J]. Macromolecules, 2002, 23(16): 3717-3722.
- [11] 刘享君, 任红, 杨洋, 等. 凝胶多糖的制备及其在可食性膜的应用[J]. 现代食品科技, 2006, 22(4): 57-60.
- [12] 詹晓北, 韩杰. 热凝胶的性质及其在食品中的应用[J]. 食品工业科技, 2001, 22(2): 85-88.
- [13] GORDON M, GURALNIK M, KANEKO Y, et al. Further clinical studies of curdlan sulfate (CRDS): An anti-HIV agent [J]. Journal of medicine, 1995, 26(3/4): 97-131.
- [14] LAROCHE C, MICHAUD P. New developments and prospective applications for β (1,3) glucans [J]. Recent patents on biotechnology, 2007, 1(1): 59-73.
- [15] KIM B S, JUNG I D, KIM J S, et al. Curdlan gels as protein drug delivery vehicles [J]. Biotechnology letters, 2000, 22(14): 1127-1130.
- [16] WEST T P. Elevated curdlan production by a mutant of *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 [J]. Journal of basic microbiology, 2009, 49(6): 589-592.
- [17] LEE J H, PARK Y H. Optimal production of curdlan by *Agrobacterium* sp. with feedback inferential control of optimal pH profile [J]. Biotechnology letters, 2001, 23(7): 525-530.
- [18] LAWFOOD H G, ROUSSEAU J D. Bioreactor design considerations in the production of high-quality microbial exopolysaccharide [J]. Applied biochemistry & biotechnology, 1991, 28(1): 667-684.
- [19] 王泽建. 凝胶多糖高产菌株的选育、发酵工艺条件优化及发酵动力学研究[D]. 南宁: 广西大学, 2004.
- [20] 詹晓北, 韩杰, 李珍雨, 等. 一株粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)产热凝胶的发酵条件[J]. 无锡轻工大学学报, 2001, 20(4): 347-350.
- [21] ZHANG H T, ZHAN X B, ZHENG Z Y, et al. Improved curdlan fermentation process based on optimization of dissolved oxygen combined with pH control and metabolic characterization of *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 [J]. Applied microbiology & biotechnology, 2012, 93(1): 367-379.
- [22] 张洪涛, 詹晓北, 郑志永, 等. 热凝胶的高产策略及功能研究进展[J]. 生物加工过程, 2009, 7(5): 8-12.
- [23] KIM M K, RYU K E, CHOI W A, et al. Enhanced production of (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan by a mutant strain of *Agrobacterium* species [J]. Biochemical engineering journal, 2003, 16(2): 163-168.
- [24] 刘楠. 凝胶多糖高产菌株的筛选及其所产多糖的定性研究[D]. 南宁: 广西大学, 2001.
- [25] 李卫旗, 何国庆. ⁶⁰Co γ 射线诱变选育热凝胶多糖高产菌株的研究[J]. 核农学报, 2003, 17(5): 343-346.
- [26] 詹晓北, 韩杰, 朱莉. 一种新型的微生物多糖食品添加剂——热凝胶[J]. 冷饮与速冻食品工业, 2001, 7(1): 27-31.
- [27] 刘毅超, 付雅欣, 陆泽斌, 等. 热凝胶多糖高产菌株的诱变选育[J]. 纤维科学与技术, 2016, 24(3): 12-16.
- [28] 中华人民共和国卫生部. 食品添加剂 可得然胶: GB 28304—2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.

名词解释

扩展引用刊数: 引用被评价期刊的期刊数, 反映被评价期刊被使用的范围。

扩展学科扩散指标: 指在统计源期刊范围内, 引用该刊的期刊数量与其所在学科全部期刊数量之比。

$$\text{扩展学科扩散指标} = \frac{\text{引用刊数}}{\text{所在学科期刊数}}$$

扩展学科扩散指标: 指期刊所在学科内, 引用该刊的期刊数占全部期刊数量的比例。

$$\text{扩展学科扩散指标} = \frac{\text{所在学科内引用被评价期刊的数量}}{\text{所在学科期刊数}}$$

扩展被引半衰期: 指该期刊在统计当年被引用的全部次数中, 较新一半是在多长一段时间内发表的。被引半衰期是测度期刊老化速度的一种指标, 通常不是针对个别文献或某一组文献, 而是对某一学科或专业领域的文献的总和而言的。

扩展 H 指数: 指该期刊在统计当年被引的论文中, 至少有 h 篇论文的被引频次不低于 h 次。

来源文献量: 指来源期刊在统计当年发表的全部论文数, 它们是统计期刊引用数据的来源。