

产胞外多糖酵母菌的分离鉴定及其 发酵条件优化

马岩石, 刘韩, 裴芳艺*

(齐齐哈尔医学院 科研处, 黑龙江 齐齐哈尔 161000)

摘要:为筛选新型高产胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)的酵母菌株, 满足工业化生产的要求, 该研究利用 WL 选择培养基和产糖基础培养基筛选出高产 EPS 的酵母菌, 通过形态特征观察、生理生化试验和 18S rDNA 技术对其进行鉴定, 并利用响应面方法对菌株产胞外多糖条件进行优化。结果表明, 从土壤中筛选得到一株高产 EPS 的酵母菌, 经鉴定, 该酵母菌为近粉红锁掷孢酵母(*Sporidiobolus pararoseus*), 命名为 *S. pararoseus* PFY-Z1, 当葡萄糖 17.34 g/L、硫酸镁 1.98 g/L、初始 pH 值 5.3 时, EPS 的含量为 (6.74 ± 0.13) g/L, 是优化前的 1.63 倍。不仅为 EPS 的生产提供菌种来源, 也为今后利用 *S. pararoseus* 大规模生产 EPS 提供理论基础。

关键词: 锁掷酵母; 分离鉴定; 胞外多糖; 响应面法; 优化

Isolation and Identification of An Exopolysaccharide-producing *Sporidiobolus* and Optimization of Fermentation Process

MA Yan-shi, LIU Han, PEI Fang-yi*

(Research Office, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161000, Heilongjiang, China)

Abstract: In order to screen new high-yield exopolysaccharides (EPS) yeast strains to meet the requirements of industrial production, the EPS-producing of strain was screened by WL selected medium and sugar medium. The strain was identified according to morphological, biochemical and 18S rDNA sequence methods. Response surface methodology was adopted to optimize the EPS-producing condition parameters. The results showed that a *Sporidiobolus* strain with high EPS-producing ability was isolated and which was identified as *Sporidiobolus pararoseus*, and named it *S. pararoseus* PFY-Z1. The optimum fermentation condition was found to consist of glucose 17.34 g/L, MgSO_4 1.98 g/L, and initial pH 5.3. The bacterium grown in the optimized medium yielded (6.74 ± 0.13) g/L of EPS, which was increased by 1.63 compared to that obtained using the unoptimized condition. This study not only provided the source of bacteria for EPS production, but also provided a theoretical basis for the large-scale production of EPS using *S. pararoseus* in the future.

Key words: *Sporidiobolus pararoseus*; isolation and identification; exopolysaccharides; response surface method; optimization

引文格式:

马岩石, 刘韩, 裴芳艺. 产胞外多糖酵母菌的分离鉴定及其发酵条件优化[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(14): 68-76

MA Yanshi, LIU Han, PEI Fangyi. Isolation and Identification of An Exopolysaccharide-producing *Sporidiobolus* and Optimization of Fermentation Process[J]. Food Research and Development, 2020, 41(14): 68-76

基金项目: 黑龙江省教育厅项目(2017-KYYWF-0699)

作者简介: 马岩石(1990—), 女(汉), 研究实习员, 硕士, 研究方向: 食品微生物学研究。

* 通信作者: 裴芳艺(1990—), 女(汉), 研究实习员, 硕士, 研究方向: 微生物资源挖掘与利用。

微生物多糖是细菌、真菌等在生长代谢过程中产生并分泌到细胞外的一类多糖^[1]。酵母多糖分为胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)和胞壁多糖^[2], 与胞壁多糖相比, 胞外多糖更易与菌体分离, 且在水溶液中呈稳定的胶体状态^[3-4]。酵母 EPS 主要由半乳糖和葡萄糖

组成,其中酵母葡聚糖是第一个被发现具有免疫活性的葡聚糖^[5],有抗肿瘤、抵抗微生物感染、抗辐射、增强机体免疫力,预防糖尿病、心血管疾病和控制体重等作用^[6-7]。但截止到目前,酵母菌 EPS 的很多特性未得到解析,因此研究酵母 EPS 具有较强的市场竞争力和广阔的发展前景。孙晓萌等从海参肠道内分离出可产 EPS 的季也蒙假丝酵母 (*Candida guilliermii*) HS-J9,对所产 EPS 抗氧化能力进行研究发现, EPS2-1 具有较强的抗氧化活性和还原力^[8]。马文锦从胶红酵母 (*Rhodotorula mucilaginosa*) CM-1 和 CICC 33013 液体培养基中分别分离得到水溶性 EPS,其产量分别为 7.35 g/L 和 6.2 g/L,对其 EPS 结构、生物活性及转录组表达差异进行了分析,弥补了 *R. mucilaginosa* 产 EPS 这一领域的技术空白^[9]。

锁掷孢酵母属 (*Sporidiobolus*) 包含锁掷孢酵母 (*S. johnsonii*)、小孢子锁掷孢酵母 (*S. microsporus*)、近玫色锁掷孢酵母 (*S. pararoseus*)、鲁宁锁掷孢酵母 (*S. ruinenii*)、赭色锁掷孢酵母 (*S. salmonicolor*)^[10]。其中 *S. pararoseus* 作为一类非常规酵母,早期研究主要集中在分类学及生态分布等方面^[11],但随着研究的不断深入,发现此类酵母在环境治理、生物防治、食品和医药等领域有着突出的作用^[12]。*S. pararoseus* 细胞不仅可以积累油脂、产生色素还可以代谢 EPS 等有益代谢产物^[13-14]。张可可等在烟草废水中分离出一株具有产油脂和色素潜力的 *S. pararoseus*,为有机酿造废水的资源化利用提供参考^[15]。赵利娜等利用蛋白质组学技术对 *S. pararoseus* 进行体外降解展青霉素 (patulin, PAT) 研究,其结果为推动生物法控制及降解 PAT 做出一定贡献^[16]。性能优良的菌种,与菌种生长相匹配的发酵条件决定发酵过程的成败^[17]。发酵过程的碳源和氮源的添加量、培养基的初始 pH 值和发酵过程各参数的控制是影响酵母 EPS 产量的关键因素^[18]。本试验以葡萄园土壤为试验材料,利用 YPD 和 WL 选择培养基筛选出高产 EPS 的菌株,通过显微形态观察、菌落形态观察、生理生化鉴定以及 18S rDNA 技术对所获得菌种进行鉴定,并以该菌株为出发菌株,通过响应面法优化菌株产 EPS 条件。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 试验材料

土壤:取自齐齐哈尔市周边某葡萄园。

1.1.2 试剂

生理生化试剂:葡萄糖、半乳糖、麦芽糖、蔗糖、蜜

二糖、乳糖、纤维二糖、松三糖、棉子糖、核糖、木糖、鼠李糖、水杨苷、甘油、木糖醇、山梨醇、甘露醇、肌醇、七叶苷、马尿酸、硝酸盐、亚硝酸盐、尿素酶、赖氨酸脱羧酶:北京陆桥技术股份有限公司;海藻糖、菊糖、淀粉、D-阿拉伯糖、L-阿拉伯糖、赤藓糖醇、核糖醇、L-精氨酸双水解酶、硫化氢:青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。葡萄糖、硫酸铵、硫酸镁、氯化钙、磷酸氢二钾、氯化钠、苯酚、硫酸、三氯乙酸:均为分析纯,天津市江天化工技术有限公司。

酵母基因组 DNA 提取试剂盒 (DP307-02)、Lyti-case 溶壁酶 (3000 U) (RT410-02)、6×DNA 电泳 Loading Buffer (RT201-01)、Agarose LE (RT101)、50×TAE Buffer (RT204)、GeneRed 核酸染料 (RT211)、D2000 DNA Marker (MD114-01)、D15000 DNA Marker (MD110-01)、2×Taq PCR Mastermix (KT201-02):天根生化科技(北京)有限公司;山梨醇 buffer (DZSL0332):北京酷来博科技有限公司。

1.1.3 培养基

YPD 琼脂培养基 (货号 HB5193)、YPD 液体培养基 (货号 HB5193-1)、WL 营养琼脂 (货号 HB0300):青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

产糖基础培养基 (g/L):葡萄糖 15,硫酸铵 15,硫酸镁 1.8,氯化钙 0.28,磷酸氢二钾 0.24,氯化钠 0.6,蒸馏水,1 L, pH 值 7.0, 121 °C 灭菌 15 min,用于产糖菌株的筛选。

1.1.4 仪器与设备

高速离心机 (22331Hamburg)、台式高速大容量冷冻离心机 (5804R):德国 Eppendorf 公司;pH 计 (FE28)、电子天平 (AL204):梅特勒-托利多集团;可见分光光度计 (V-5000):上海元析仪器有限公司;电热恒温培养箱 (DHP-9162)、落地振荡器 (HZQ-211C):上海一恒科学仪器有限公司;PCR 仪 (C1000-touch)、全自动荧光和化学发光成像分析系统 (ChemiDoc MP):美国 Bio-rad;光学显微镜 (CX31):日本 Olympus 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 *S. pararoseus* 菌株的初步分离筛选

称量 10.0 g 葡萄园中采集的土壤,放入 100 mL 无菌水内振荡培养 1 h,制成菌悬液,梯度稀释至 10^{-7} ,分别取每个梯度的稀释液 0.1 mL 涂布于 YPD 固体培养基上,每个稀释度作 2 个平行样,28 °C 培养 3 d,挑取单菌落保存备用。

将保藏的菌株用 YPD 液体培养基活化后,三区划线的方法接种于 WL 固体培养基上,28 °C 培养 7 d 后,挑取单菌落保存备用。

1.2.2 形态特征观察

将菌株接种到 YPD 液体培养基中,28 ℃培养 3 d,在显微镜下观察菌体的形状、大小及繁殖方式。分别将菌株三区划线于 YPD、WL 固体培养基上,28 ℃培养 7 d,观察其形成的菌落颜色、质地、表面形态、边缘形态及培养基颜色变化情况^[10,19]。

1.2.3 高产 EPS 菌株的筛选

利用苯酚-硫酸法测定发酵液中 EPS 含量^[20],筛选出高产 EPS 的菌株。取 1.5 mL 发酵液,12 000 r/min 离心 10 min,将上清液适当稀释后取 1 mL 与 1 mL 体积分数 6% 的苯酚溶液和 5 mL 浓硫酸溶液混匀,静置冷却至 25 ℃后,于波长 490 nm 处测定吸光度值。以葡萄糖为标准制作标准曲线^[21],根据标准曲线计算发酵液中 EPS 的含量。

1.2.4 生理生化特征鉴定

按照试剂盒说明书要求,制备菌悬液,接种生化试剂管,28 ℃培养 2 d 后观察^[10,22]。同化试验碳源主要包括葡萄糖、半乳糖、麦芽糖、蔗糖、海藻糖、蜜二糖、乳糖、纤维二糖、松三糖、棉子糖、菊糖、淀粉、核糖、木糖、D-阿拉伯糖、L-阿拉伯糖、鼠李糖、水杨苷、甘油、赤藓糖醇、核糖醇、木糖醇、山梨醇、甘露醇、肌醇、七叶苷、马尿酸。氮源主要包括硝酸盐、亚硝酸盐和赖氨酸脱羧酶、L-精氨酸双水解。其它生化试验主要包括:尿素酶、葡萄糖产气试验、硫化氢试验。

1.2.5 18S rDNA 序列分析及构建系统发育树

基因组 DNA 提取:活化的种子液经 12 000 r/min 离心 1 min 后收集沉淀。按照基因组 DNA 提取试剂盒说明书,提取基因组 DNA。以 NS1:5'-GTAGTCATATGCTTG TCTC 3';NS6:5'-GCATC ACAGA CCTGT TATTG CCTC 3' 为引物进行 18S rDNA 部分序列扩增。聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)扩增体系:2×Taq PCR Mastermix 25 μL;模板 DNA 2 μL;上下游引物各 1 μL;补加 ddH₂O 至 50 μL。PCR 扩增条件:95 ℃预变性 5 min;95 ℃变性 30 s,58 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 90 s,35 个循环;72 ℃再延伸 7 min。PCR 产物经凝胶验证后,送上海生工生物公司测序。测序结果上传至 NCBI 数据库,获得 GeneBank 登录号。在 NCBI 数据库中进行 BLAST,利用 MEGA 5.0,Neighbor-Joining 方法构建系统发育树,确定菌株同源性和种属水平^[23-24]。

1.2.6 Plackett-Burman(PB)试验设计

根据基础产糖培养基的成分,在单因素试验的基础上,确定影响 EPS 产量的 8 个因素(葡萄糖、硫酸铵、硫酸镁、氯化钙、磷酸氢二钾、氯化钠、装液量、初始 pH 值),及每个因素的水平范围。以 EPS 产量 Y 为响应值,将每个因素分为高(+1)、低(-1)2 个水平。Plackett-Burman(PB)试验设计因素与水平见表 1,共进行 15 组试验,每组 3 个平行^[25-26]。以 2% 的接种量接种,28 ℃ 140 r/min 振荡培养 5 d。

表 1 两水平析因试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of factorial tests with two levels

试验水平	试验因素							
	X_1 葡萄糖/(g/L)	X_2 硫酸铵/(g/L)	X_3 硫酸镁/(g/L)	X_4 氯化钙/(g/L)	X_5 磷酸氢二钾/(g/L)	X_6 氯化钠/(g/L)	X_7 装液量/(mL/250 mL)	X_8 初始 pH 值
-1	10	10	0.9	0.14	0.12	0.3	50	5.5
0	15	15	1.8	0.28	0.24	0.6	100	7
1	20	20	2.7	0.42	0.36	0.9	150	8.5

1.2.7 中心组合试验(central composite design, CCD)

根据 PB 试验的结果,以 EPS 产量 Y 为响应值,对 EPS 产量的影响因素葡萄糖、硫酸镁、初始 pH 值,进行响应面分析试验,得到最优方案。响应面试验设计因素与水平见表 2。

1.2.8 验证试验

多糖的提取参照 DU 等的方法^[27]。菌株以 2% 接种量接种到优化后的发酵培养基中,28 ℃ 140 r/min 振荡培养 5 d 得到发酵液。4 ℃、11 000 r/min 离心 20 min 去除菌体。在上清液中加入 3 倍体积的预冷体积分数 95% 的乙醇,4 ℃过夜,4 ℃、11 000 r/min 离心 20 min

表 2 中心组合设计因素与水平

Table 2 Factors and levels of central composite design

试验水平	试验因素		
	X_1 葡萄糖/(g/L)	X_3 硫酸镁/(g/L)	X_8 初始 pH 值
-1.68	6.59	0.29	4.48
-1	10	0.9	5.5
0	15	1.8	7
1	20	2.7	8.5
1.68	23.41	3.31	9.52

收集沉淀,用适量去离子水溶解多糖沉淀,加入等体积的 10% 三氯乙酸,充分搅拌,4 ℃静置 24 h,4 ℃、

11 000 r/min 离心 20 min,去除沉淀。在上清中加入 3 倍体积的预冷体积分数 95 % 的乙醇,4 ℃ 过夜,4 ℃、11 000 r/min 离心 20 min 收集多糖沉淀,溶于 50 mL 去离子水中,装入透析袋,4 ℃ 透析 2 d,每 8 h 换 1 次水。

1.3 数据统计分析

响应面试验设计使用 Design Expert 8.0;系统发育树构建使用 MEGA 5.0;统计分析使用 SPSS 19.0,以 $p < 0.05$ 为差异显著, $p < 0.01$ 为差异极显著;绘图使用 Excel 2016。

2 结果与分析

2.1 试验菌株的筛选

通过菌落形态观察和苯酚-硫酸法测定发酵液中 EPS 含量,共得到 4 株具有产糖能力的 *S. pararoseus*, EPS 产量分别为 PFY-B1 菌株(3.58 ± 0.12)g/L、PFY-F1 菌株(2.92 ± 0.19)g/L、PFY-G1 菌株(3.27 ± 0.22)g/L、PFY-Z1 菌株(4.14 ± 0.11)g/L($p < 0.05$)。包怡红等从自然界中筛选获得 1 株可以产 EPS 的东方伊萨酵母(*Is-satchenkia orientalis*)Z20, EPS 产量为 1.137 g/L^[28]。孙晓萌等从海参肠道中分离分离出可产 EPS 的 *C. guil-liermind* HS-J9, EPS 产量为 0.137 g/L^[8]。与上述研究相比,本研究分离得到的酵母菌产糖能力相对较强。因此,选择 PFY-Z1 菌株为出发菌株进行后续试验。

2.2 菌株形态观察

菌株 PFY-Z1 在 YPD、WL 固体培养基上生长形态见图 1。

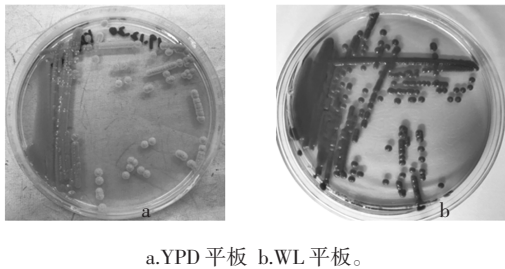


图 1 菌株 PFY-Z1 在 YPD、WL 平板上的菌落形态
Fig.1 Colony morphology of strain PFY-Z1 on YPD and WL agar plate

在 YPD 平板上培养前 3 d 与其它酵母菌株无明显区别,但不随着培养时间延长而改变颜色,观察单菌落形态为表面凸起、有褶皱、不透明、圆形、边缘锯齿状。该菌落形态与李侨飞在葡萄园采集样品中分离得到的 *S. pararoseus* Y16 形态一致^[29]。在 WL 平板上,培养初期单菌落表面有褶皱、圆形、边缘锯齿状,培养 4 d 后表面褶皱逐渐消失,表面光滑。

显微镜观察结果见图 2,细胞呈椭圆形,与一般酵

母相似,表现出明显的出芽生殖。

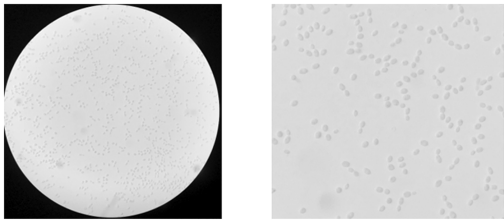


图 2 菌株 PFY-Z1 显微形态观察(640×)
Fig.2 The microscopic morphology of strain PFY-Z1(640×)

2.3 生理生化鉴定

参考《常见与常用真菌》^[22]及《酵母菌的特征与鉴定手册》^[10],对菌株 PFY-Z1 的部分生理生化性质进行了研究,结果见表 3。菌株 PFY-Z1 在 28 ℃ 培养时生长良好,可利用碳源种类较少,氮源利用率相对较好,生长无运动性,尿素酶为阳性。

表 3 菌株 PFY-Z1 的部分生理生化特性
Table 3 Physiological and biochemical results of the strain PFY-Z1

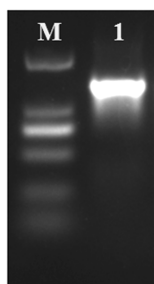
编号	指标	结果	编号	指标	结果
1	葡萄糖	w	18	水杨苷	-
2	半乳糖	-	19	甘油	-
3	麦芽糖	-	20	赤藓糖醇	w
4	蔗糖	w	21	核糖醇	-
5	海藻糖	w	22	木糖醇	-
6	蜜二糖	-	23	山梨醇	-
7	乳糖	-	24	甘露醇	-
8	纤维二糖	-	25	肌醇	-
9	松三糖	-	26	七叶苷	+
10	棉子糖	w	27	马尿酸	-
11	菊糖	w	28	硝酸盐	-
12	淀粉	-	29	亚硝酸盐	-
13	核糖	-	30	赖氨酸脱羧酶	+
14	木糖	-	31	L-精氨酸双水解	+
15	D-阿拉伯糖	-	32	尿素酶	+
16	L-阿拉伯糖	-	33	葡萄糖(产气)	-
17	鼠李糖	-	34	硫化氢	-

注:“+”代表代谢反应阳性,“-”代表代谢反应阴性,“w”代表代谢反应弱阳性。

2.4 18S rDNA 序列分析和系统发育树构建

提取菌株 PFY-Z1 的基因组 DNA,PCR 反应扩增菌株的 18S rDNA 序列,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后,在 1 300 bp 处获得清晰条带,结果见图 3。

PCR 产物送上海生工生物工程有限公司进行测序,将测序结果与 GenBank 公布的数据库进行比对,通过比对发现该菌株与 *S. pararoseus* 相似度极高,同源性>99 %,结果上传到 NCBI 数据库,获得 GeneBank



DL2000 DNA Marker 由 DNA 片段 2 000 bp、1 000 bp、750 bp、500 bp、250 bp 以及 100 bp 组成,共6条带。泳道 1 为菌株 PFY-Z1 的扩增产物。

图3 菌株 PFY-Z1 的 18S rDNA PCR 扩增结果

Fig.3 Electrophoregram of 18S rDNA amplification products of PFY-Z1

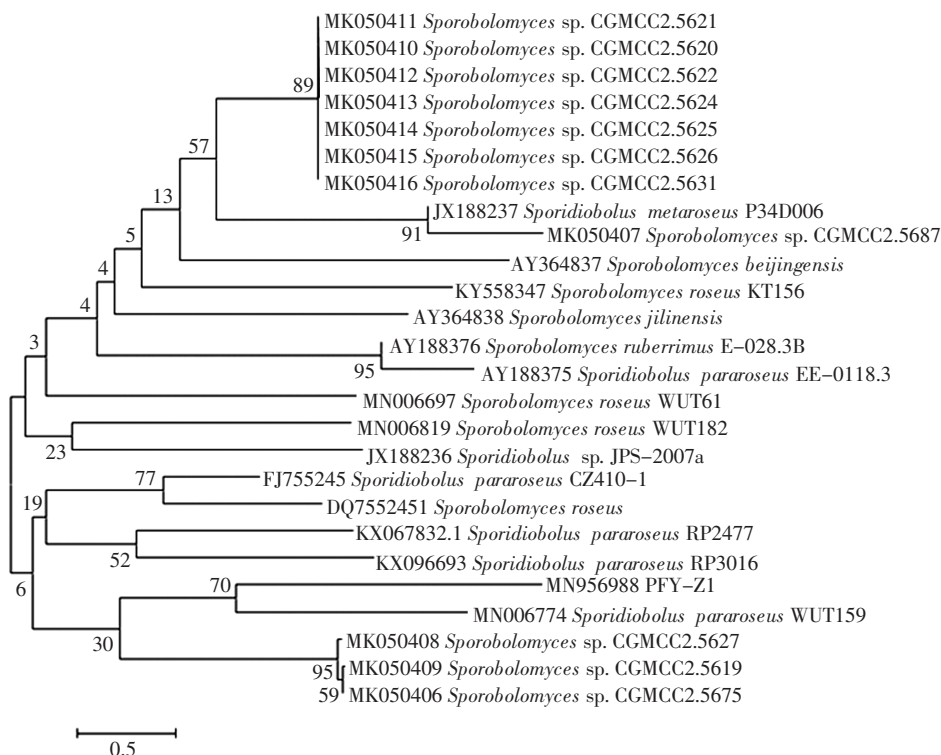


图4 Neighbor-Joining 法构建菌株 PFY-Z1 的 18S rDNA 系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of strain PFY-Z1 18S rDNA base on using Neighbor-Joining method

表4 PB 试验设计及统计结果

Table 4 Experimental design and results of the PB design

处理	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	EPS 产量/(g/L)	处理	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	EPS 产量/(g/L)
1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	5.12±0.16	9	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	6.57±0.17
2	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	4.48±0.11	10	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	3.59±0.09
3	1	-1	1	1	-1	1	1	1	3.56±0.17	11	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	6.74±0.18
4	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	2.49±0.11	12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	3.08±0.22
5	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	3.24±0.16	13	0	0	0	0	0	0	0	0	6.35±0.16
6	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	2.99±0.17	14	0	0	0	0	0	0	0	0	6.47±0.12
7	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	3.08±0.21	15	0	0	0	0	0	0	0	0	6.40±0.17
8	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	3.54±0.11										

登录号为 MN956988。

应用 Mega5.0 软件中的 Neighbor-Joining 法构建系统发育树,将菌株 PFY-Z1 与 25 株菌的核酸序列进行比对,按比例绘制系统发育树,见图 4。因此将该菌株命名为 *S. pararoseus* PFY-Z1。

2.5 PB 试验

微生物发酵产 EPS 不仅受自身性质影响,培养及成份和初始 pH 值对其 EPS 产量也具有显著影响^[30]。微生物只有在特定的条件下才能产生 EPS,并且不同的条件会产生不同种类的 EPS^[31]。因此,本试验在对菌株 PFY-Z1 产 EPS 单因素试验基础上,设计 PB 试验,确定对菌株 PFY-Z1 产 EPS 具有显著影响的因素。试验设计及结果见表 4,回归分析结果见表 5。

表 5 PB 试验回归分析结果
Table 5 Results of the regression analysis of the PB design

项	回归分析系数	F 值	$p> F $
模型	4.04	12.33	0.031 6*
X_1	0.73	29.78	0.012 1*
X_2	0.26	3.75	0.148 4
X_3	0.66	24.21	0.016 1*
X_4	0.042	0.097	0.775 3
X_5	0.15	1.29	0.338 4
X_6	-0.22	2.68	0.200 4
X_7	-0.18	1.79	0.273 8
X_8	-0.79	35.04	0.009 6**

注: $p<0.05$ 为显著*; $p<0.01$ 为极显著**。

由表 4 可知,EPS 产量从 (2.49 ± 0.11) g/L 升到 (6.74 ± 0.18) g/L,说明培养基成分对发酵菌株产 EPS 有很大影响。根据 PB 试验结果,得到模型拟合方程如下:EPS 含量= $4.04+0.73X_1+0.26X_2+0.66X_3+0.042X_4+0.15X_5-0.22X_6-0.18X_7-0.79X_8$ 。

由表 5 可知,模型 F 值为 12.33,两水平析因试验模型项显著($p=0.031\ 6<0.05$),表明该模型具有重要意义, $R^2=0.970\ 5$,说明存在 97.05 %的试验数据可用该模型解释,调整 $R^2=0.891\ 8$,信噪比= $10.465(>4)$,证明该模型可以很好的拟合试验数据。由 p 值可用于判断各变量对 EPS 影响的显著性可知,各变量对 EPS 影响显著程度依次为 $X_8>X_1>X_3>X_2>X_6>X_7>X_5>X_4$,即葡萄糖(X_1)对菌株 PFY-Z1 的 EPS 产量影响显著($p=0.012\ 1<0.05$),具有正效应;硫酸镁(X_3)对菌株 PFY-Z1 的 EPS 产量影响显著($p=0.016\ 1<0.05$),具有正效应;初始 pH 值对 EPS 产量影响极显著($p=0.009\ 6<0.01$),具有负效应。其他变量在 PB 试验条件下对菌株的 EPS 产量无显著影响,因此选择葡萄糖、硫酸镁、初始 pH 值 3 个因素进行 CCD 试验。碳源是影响微生物产 EPS 的重要因素,添加碳源的含量直接影响 EPS 的含量^[32]。包怡红等通过对 *L. orientalis* Z20 产糖培养基优化发现,乳糖和蔗糖基本不被利用合成 EPS,果糖和葡萄糖相比,葡萄糖有利于 EPS,对葡萄糖添加量进行优化后,结果显示,添加 8 %葡萄糖时,EPS 产量最大为 2.046 g/L^[28]。韩梅等的研究显示,*S. pararoseus* JD-2 产 EPS 的氮源中 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 最有利于 EPS 积累^[33]。杨迎凤等研究发现, Mg^{2+} 对 EPS 的产量有促进作用,当添加 0.01 %的 MgSO_4 时,酵母菌 YF-01 的 EPS 产量为 4.672 g/L^[34]。马文锦的研究显示,当 MgSO_4 含量为 0.1 %时,*R. mucilaginosa* CICC33013 的 EPS 产量为 6.2 g/L^[9]。赵英杰等^[35]、包怡红等^[28]、杨迎凤等^[34]、韩梅等^[17]的研究均显示初始

pH 值在 5~6 范围时,最有利于酵母菌产 EPS,与本试验结果相一致。

2.6 CCD 试验

菌株 PFY-Z1 产 EPS 含量 CCD 试验结果见表 6,回归分析见表 7。

表 6 CCD 试验设计及结果
Table 6 Experimental design and results of the CCD

处理	X_1	X_3	X_8	EPS 产量/(g/L)	
				测量值	预测值
1	-1	-1	-1	4.09±0.21	4.03
2	1	-1	-1	5.07±0.19	5.37
3	-1	1	-1	5.45±0.16	5.19
4	1	1	-1	5.58±0.17	5.97
5	-1	-1	1	3.58±0.11	3.13
6	1	-1	1	4.12±0.13	4.33
7	-1	1	1	4.07±0.13	3.72
8	1	1	1	4.35±0.18	4.35
9	-1.682	0	0	3.59±0.17	4.23
10	1.682	0	0	6.45±0.22	5.89
11	0	-1.682	0	3.89±0.16	3.86
12	0	1.682	0	4.76±0.14	4.86
13	0	0	-1.682	5.77±0.09	5.52
14	0	0	1.682	3.08±0.11	3.40
15	0	0	0	6.58±0.15	6.52
16	0	0	0	6.64±0.16	6.52
17	0	0	0	6.49±0.12	6.52
18	0	0	0	6.42±0.12	6.52
19	0	0	0	6.61±0.18	6.52
20	0	0	0	6.39±0.22	6.52

表 7 CCD 试验回归分析结果
Table 7 Results of the regression analysis of the CCD

项	回归分析系数	F 值	$p> F $
模型	6.52	18.33	<0.000 1
X_1	0.49	20.34	0.001 1**
X_2	0.30	7.36	0.021 8*
X_9	-0.63	33.08	0.000 2**
X_1X_2	-0.14	0.94	0.354 7
X_1X_9	-0.036	0.064	0.805 0
X_2X_9	-0.14	1.01	0.338 4
X_1^2	-0.52	23.56	0.000 7**
X_2^2	-0.76	51.28	<0.000 1
X_9^2	-0.73	46.63	<0.000 1

注: $p<0.05$ 为显著*, $p<0.01$ 为极显著**。

由表 6 和表 7 可知,CCD 试验模型项极显著 ($p<0.000\ 1$), $R^2=0.942\ 9$,说明存在 94.29 %的试验数据可用该模型解释,调整 $R^2=0.891\ 4$,信噪比= $11.84(>4)$,变

异系数 $CV=7.85\%$, 表明试验结果所得模型能够较好的拟合试验数据。葡萄糖含量(X_1)和初始 pH 值(X_8)及各变量二次项(X_1^2 、 X_3^2 、 X_8^2)对菌株的 EPS 产量有极显著影响($p<0.01$), 硫酸镁含量(X_3)对菌株 EPS 产量

有显著影响($p<0.05$), X_1X_3 、 X_1X_8 、 X_3X_8 对菌株的 EPS 产量无显著影响($p>0.05$)。各变量间的相互作用对菌株 EPS 产量影响见图 5~图 7。

根据 CCD 试验结果, 得到模型拟合方程如下: EPS

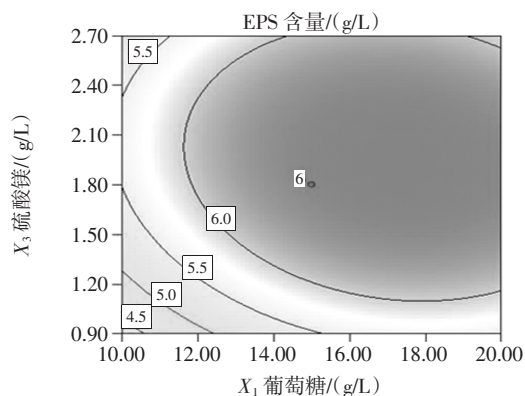


图 5 葡萄糖和硫酸镁对菌株产糖影响的等高线图和曲面图

Fig.5 The contour plot and surface response of EPS yield vs glucose and $MgSO_4$

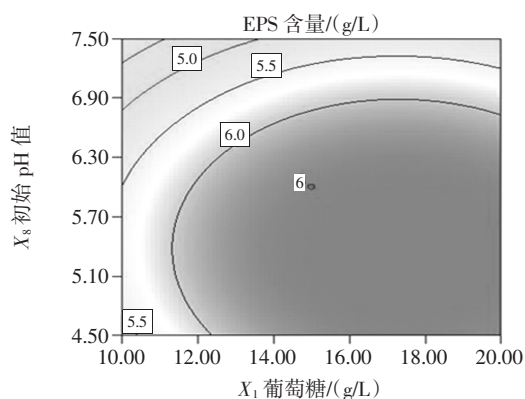
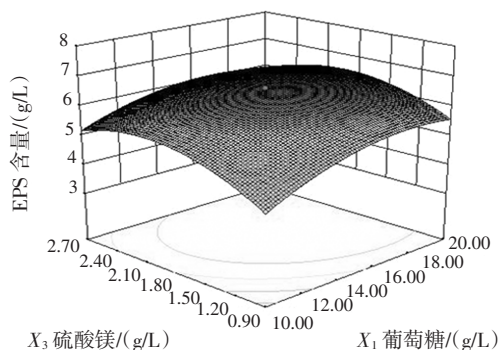


图 6 葡萄糖和 pH 值对菌株产糖影响的高线图 and 等曲面图

Fig.6 The contour plot and surface response of EPS yield vs glucose and pH

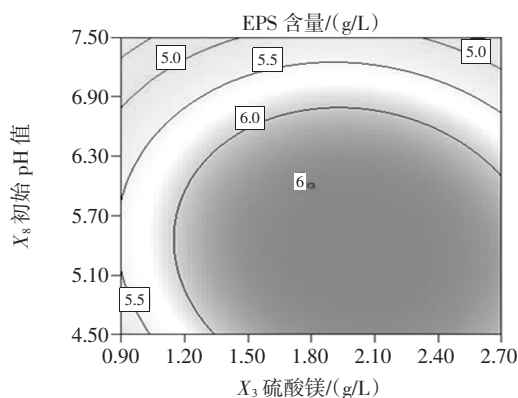
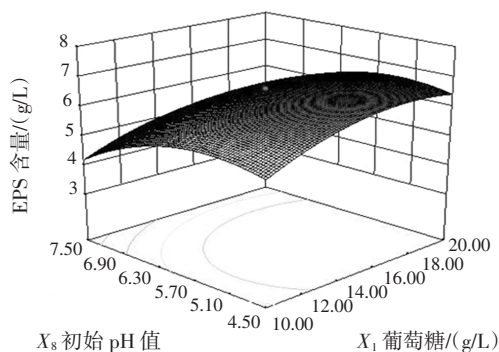
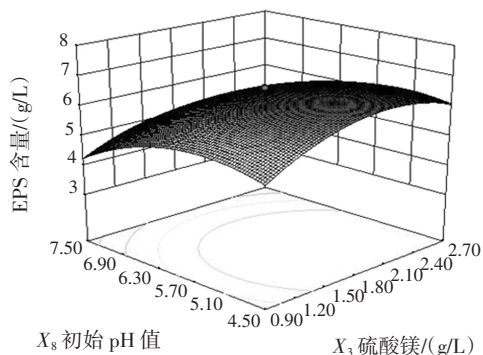


图 7 硫酸镁和 pH 值对菌株产糖影响的等高线图和曲面图

Fig.7 The contour plot and surface response of EPS yield vs $MgSO_4$ and pH



含量 $=6.52+0.49X_1+0.3X_3-0.63X_8-0.14X_1X_3-0.036X_1X_8-0.14X_3X_8-0.52X_1^2-0.76X_3^2-0.73X_8^2$ 。模型方程中二次项系数均为负, 可知该方程拟合的曲面开口朝下, 方程

有极大值。预测葡萄糖糖含量、硫酸镁含量和初始 pH 值分别为 17.34、1.98 g/L 和 5.3 时, 方程有极大值, EPS 的预测产量为 6.81 g/L。

变量间的相互作用关系可从等高线图和曲面图形状看出,椭圆形表明变量间的相互作用有显著影响,圆形则表明无显著影响。由图 5 可知,当初始 pH 值为 6 时,葡萄糖和硫酸镁的交互作用对 EPS 的合成影响不显著;以葡萄糖含量为定值,随硫酸镁含量的增加,EPS 产量先增加再减少,硫酸镁含量在接近 1.8 g/L 时,EPS 含量最高,以硫酸镁含量为定值,EPS 含量随葡萄糖含量的增加呈现先上升后趋于缓慢下降趋势,葡萄糖含量在 16 g/L~18 g/L 时,EPS 含量最高。由图 6 可知,当硫酸镁为 1.8 g/L 时,葡萄糖和初始 pH 值的交互作用对 EPS 的合成影响不显著。由图 7 可知,当葡萄糖为 15 g/L 时,初始 pH 值和硫酸镁的交互作用对 EPS 的合成影响不显著,以硫酸镁为定值,EPS 的产量随 pH 值的升高而降低。

2.7 验证试验

使用中心组合试验中预测最佳产 EPS 试验点进行验证试验,在此条件下,菌株 PFY-Z1 的 EPS 含量为 (6.74 ± 0.13) g/L,与预测值 6.81 g/L 无显著差异 ($p > 0.05$)。响应面法优化后,菌株 PFY-Z1 产 EPS 水平是优化前 (4.14 ± 0.11) g/L 的 1.63 倍。赵英杰等从乳扇中获得 9 株产 EPS 能力较好的酵母菌株,其中金黄色隐球酵母 (*Cryptococcus aureus*) DF-12 产 EPS 能力最强,优化后 EPS 含量为 3.511 g/L^[35]。PAVLOVA 等从南极分离出 4 株产糖酵母,在以葡萄糖为碳源的培养基中 EPS 产量为 1.75 g/L~2.63 g/L^[36],优化后罗伦隐球菌 (*Cryptococcus laurentii*) AL100 在发酵 96 h 的时候可以产生 6.4 g/L 的 EPS^[37]。与此相比,本试验获得 *S. pararo-seus* PFY-Z1 不仅自身 EPS 产量相对较高,而且优化后 EPS 产量也高于目前所报道的大部分菌株。

3 结论

本试验从葡萄园土壤中分离得到一株高产 EPS 的酵母菌,经形态学鉴定、生理生化试验和分子生物学试验鉴定该菌株为 *S. pararo-seus*,并命名为 *S. pararo-seus* PFY-Z1。以该菌株为出发菌株,采用响应面方法优化菌株产 EPS 条件。首先,两水平析因试验设计结果表明,葡萄糖、硫酸镁和无初始 pH 值对 *S. pararo-seus* PFY-Z1 产 EPS 有显著影响。CCD 试验表明葡萄糖含量、硫酸镁含量和初始 pH 值分别为 17.34 g/L、1.98 g/L 和 5.3 时,EPS 的产量最高为 (6.74 ± 0.13) g/L,是优化前 (4.14 ± 0.11) g/L 的 1.63 倍。因此,利用 *S. pararo-seus* PFY-Z1 发酵产 EPS,不仅为 EPS 的生产提供了菌种来源,也为今后利用 *S. pararo-seus* 大规模生产 EPS 提供了理论基础。

参考文献:

- [1] LI Q, LI Y M, HAN S, et al. Optimization of fermentation conditions and properties of an exopolysaccharide from *Klebsiella*.sp. H-207 and application in adsorption of hexavalent chromium[J]. PloS One, 2013, 8(1): e53542
- [2] 艾自明,任慧霞. 酿酒酵母胞壁多糖研究概述[J]. 中南药学, 2009, 7(10): 762-765
- [3] BZDUCHA-WRÓBEL A, KIELISZEK M, BŁĄŻEJAK S. Chemical composition of the cell wall of probiotic and brewer's yeast in response to cultivation medium with glycerol as a carbon source[J]. European Food Research and Technology, 2013, 237(4): 489-499
- [4] SHAH A M, CHAUDHURI T K, MISHRA S. Strategy for purification of aggregation prone β -glucosidases from the cell wall of yeast: a preparative scale approach[J]. New Biotechnology, 2012, 29(3): 311-320
- [5] 胡成武,李彪. 酵母细胞壁多糖在水产中的应用[J]. 中国牧业通讯, 2009(3): 22-23
- [6] 王珊珊,蔡超,郝杰杰,等. 水溶性酵母 β -葡聚糖的制备及免疫活性评价[J]. 高等学校化学学报, 2019, 40(9): 1873-1880
- [7] TANG Q, HUANG G, ZHAO F, et al. The antioxidant activities of six (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan derivatives prepared from yeast cell wall[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 98:216-221
- [8] 孙晓萌,王上,丛丽娜,等. 季也蒙假丝酵母胞外多糖的分离纯化及抗氧化活性研究[J]. 工业微生物, 2016, 46(2): 24-29
- [9] 马文锦. 两株胶红酵母菌的胞外多糖结构、生物活性及转录组表达差异分析[D]. 西安:陕西科技大学, 2018: 20-30
- [10] 胡瑞卿,方善康. 酵母菌的特征与鉴定手册[M]. 青岛:青岛海洋大学出版社, 1991
- [11] 魏娜,徐琼,张宁,等. 掷孢酵母及其应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2014, 41(6): 1211-1218
- [12] LI H L, WANG X L, ZHAO H Z, et al. Low folate concentration impacts mismatch repair deficiency in neural tube defects[J]. Epigenomics, 2020, 12(1): 5-18
- [13] WEI C, WU T, AO H Y, et al. Increased torulene production by the red yeast, *Sporidiobolus pararo-seus*, using citrus juice[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2020, 50(1): 66-73
- [14] MANDOUR H, ABDELHAI, FAISAL NURELDIN AWAD, et al. Enhancement the biocontrol efficacy of *Sporidiobolus pararo-seus* Y16 against apple blue mold decay by glycine betaine and its mechanism[J/OL]. Biological Control, 2019, 139. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104079>
- [15] 张可可,席宇,程方,等. 烟草废水中红色酵母菌的分离鉴定及其胞内色素和油脂的初步研究[J]. 中国酿造, 2019, 38(9): 32-35
- [16] 赵利娜,孙艺文,张晓云,等. 拟粉红锁掷孢酵母降解展青霉素的蛋白质组学[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(3): 10-16
- [17] 韩梅. 锁掷酵母联产油脂和胞外多糖的研究[D]. 无锡:江南大学, 2017
- [18] MARKUS B, SUNNY S, STEFANIE K, et al. Partial Methylation at Am100 in 18S rRNA of Baker's Yeast Reveals Ribosome Hetero-

- geneity on the Level of Eukaryotic rRNA Modification[J]. PLoS ONE, 2014, 9(2): e89640
- [19] 汪洋. 一株胶红酵母的鉴定及其产类胡萝卜素的性能研究[D]. 兰州:西北师范大学, 2015
- [20] 叶广彬, 陈源红, 王长丽, 等. 柠檬明串珠菌 TD1 产胞外多糖条件的响应面法优化及其抗氧化性研究[J]. 中国酿造, 2018, 37(11): 70-75
- [21] 黄承敏, 肖茜, 王蓉蓉, 等. 一株高产胞外多糖乳酸菌的分离鉴定及其产胞外多糖的研究[J]. 中国酿造, 2019, 38(1): 80-83
- [22] 中国科学院微生物研究所. 常见与常用真菌[M]. 北京:科学出版社, 1973
- [23] BRITTA M, PHILIP W J, SUNNY S, et al. Ribosome biogenesis factor Tsr3 is the aminocarboxypropyl transferase responsible for 18S rRNA hypermodification in yeast and humans[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(9): 4304-4316
- [24] 窦晓, 杨建刚, 曹新志, 等. 基于 26S rRNA D1/D2 区序列对不同时期大曲中酵母菌的分离与鉴定[J]. 现代食品科技, 2018, 34(2): 97-101
- [25] 刘刚, 梁琪, 宋雪梅, 等. Plackett-Burman 和 Box-Behnken 试验优化嗜热链球菌 Q4F8 产胞外多糖工艺[J]. 食品科学, 2019, 40(20): 136-143
- [26] SOREL T S, GERD H, JOSEPHINE B, et al. A New Approach of Extraction of α -Amylase/trypsin Inhibitors from Wheat (*Triticum aestivum* L.), Based on Optimization Using Plackett-Burman and Box-Behnken Designs[J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2019, 24(19): 3589-3607
- [27] DU R P, XING H W, YANG Y P, et al. Optimization, purification and structural characterization of a dextran produced by *L.mesen-teroides* isolated from Chinese sauerkraut[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 174: 409-416
- [28] 包怡红, 梁雪, 李锐达, 等. 产胞外多糖酵母菌株的筛选鉴定及发酵产糖[J]. 微生物学报, 2010, 50(2): 278-283
- [29] 李侨飞. 拟粉红锁掷孢酵母 Y16 控制葡萄采后病害及其机制和制剂化研究[D]. 镇江:江苏大学, 2017
- [30] GIENTKA I, BŁAŻEJAK S, STASIAK-RÓŻAŃSKA L, et al. Exopolysaccharides from yeast: insight into optimal conditions for biosynthesis, chemical composition and functional properties review[J]. Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria, 2015, 14(4): 283-292
- [31] SENGUPTA D, DATTA S, BISWAS D. Towards a better production of bacterial exopolysaccharides by controlling genetic as well as physico-chemical parameters[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(2): 1587-1598
- [32] GIENTKA I, BZDUCHA-WRÓBEL A L, STASIAK-RÓŻAŃSKA L, et al. The exopolysaccharides biosynthesis by Candida, yeast depends on carbon sources[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2016, 22: 31-37
- [33] 韩梅, 徐致远, 苏米. 锁掷酵母产胞外多糖的研究[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(2): 43-46
- [34] 杨迎凤, 杨文娟, 杨锐, 等. 响应面法优化酵母菌产胞外多糖培养基的研究[J]. 中国酿造, 2014, 33(9): 115-119
- [35] 赵英杰, 张文平, 吴剑梅, 等. 乳扇中高产胞外多糖酵母菌的筛选及其抗氧化活性[J]. 食品科学, 2019, 40(22): 134-140
- [36] PAVLOVA K, PANCHEV I, KRACHANOVA M, et al. Production of an exopolysaccharide by antarctic yeast [J]. Folia Microbiologica, 2009, 54(4): 343-348
- [37] PAVLOVA K, RUSINOVA-VIDEVA S, KUNCHEVA M, et al. Synthesis and characterization of an exopolysaccharide by Antarctic yeast strain *Cryptococcus laurentii* AL100[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011, 163(8): 1038-1052

收稿日期:2020-03-17