

少动鞘脂单胞菌 S1 胞外多糖发酵工艺条件研究*

彭志英 张红城 赵谋明 钟颜麟

(华南理工大学生物科学与工程研究中心 广州 510640)

摘要: 研究了摇瓶培养条件下少动鞘脂单胞菌 S1 的胞外多糖的发酵工艺。S1 菌的发酵产胶可采用二步发酵法: 第一阶段, 培养基成分为: 蔗糖 10g, NH_4NO_3 0.5g, KH_2PO_4 0.5g, MnSO_4 0.3g, MgSO_4 0.1g, 吐温 80 0.02g 溶于蒸馏水并定容至 1000mL, pH7.2 \pm 0.1, 温度 33 $^\circ\text{C}$ ~ 35 $^\circ\text{C}$, 高溶氧。第二阶段, 发酵 10~12h 后, 补加蔗糖 40g/L, 温度 24 $^\circ\text{C}$ ~ 25 $^\circ\text{C}$, pH6.5 \pm 0.1, 高溶氧(激烈振荡)。S1 菌胞外多糖的产量最高可达 8.98g/L, 发酵液粘度最高可达 45000mPa \cdot s。

关键词: 少动鞘脂单胞菌 S1, 胞外多糖, 发酵

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)02-0097-04

* 广东省自然科学基金会、华南生物科学与技术研究中心资助项目 (No. 960257)

Sponsored by the Natural Science Fundation of Guangdong Province and the Bioscience & Technology Research Center of South China (No. 960257)

收稿日期: 1998-11-09, 修回日期: 1999-01-08

OPTIMIZATION OF EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCTION BY *SPHINGOMONAS PAUCIMOBILIS* S1

PENG Zhi-Ying, ZHANG Hong-Cheng, ZHAO Mou-Ming, ZHONG Yan-Lin

(Bioscience and Bioengineering Research Center, South China University of Technology, Guangzhou 510640)

Abstract: Nutritional requirements and optimal condition for exopolysaccharide (EPS) production by *Sphingomonas paucimobilis* S1 were studied. A two-stage fermentation process was conducted as follows: in the earlier stage which lasted for 10~12h, the initial medium contained the following: sucrose 10g, NH_4NO_3 0.5g, KH_2PO_4 0.5g, MnSO_4 0.3g, MgSO_4 0.1g, Tween 80 0.02g, which is dissolved in distilled water to 1000ml, the pH and temperature were 7.2 ± 0.1 and $33 \sim 35^\circ\text{C}$ respectively; in the successive stage, 40g/L of sucrose was added into the broth, and the pH and temperature were 6.5 ± 0.1 and $24 \sim 25^\circ\text{C}$ respectively. In both stages, highly resolved O_2 (vigorous agitation) was required. Maximum yield of the EPS (8.98g/L) and maximum viscosity of the broth (45000mPa·s) were observed under optimal condition.

Key words: *Sphingomonas paucimobilis* S1, Exopolysaccharide (EPS), Fermentation

微生物胞外多糖(exopolysaccharide, EPS)是工业微生物研究与开发的热点之一^[1],由少动鞘脂单胞菌(*Sphingomonas paucimobilis*)生产的结凝胶(Gellan Gum)具有优良的性能,1992年获美国FDA批准可应用于食品^[1]。本文作者从环境中筛选出一株产胶菌S1,经初步鉴定为少动鞘脂单胞菌。本文报道摇瓶培养条件下S1菌胞外多糖发酵工艺的研究结果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:从环境中筛出,经初步鉴定为少动鞘脂单胞菌。

1.1.2 试剂:葡萄糖、蔗糖、乳糖、玉米淀粉、尿素、蛋白胨、酵母膏、牛肉膏、 NH_4NO_3 、 KNO_3 、 MnSO_4 、 MgSO_4 、 KH_2PO_4 、 CaCl_2 、吐温40、吐温80。

1.1.3 培养基:蔗糖20g,蛋白胨0.5g, KH_2PO_4 0.5g, MgSO_4 0.1g, NH_4NO_3 0.9g溶于蒸馏水并定容至1000mL,调pH值为7.0~7.2, 1×10^5 Pa灭菌15min,供最初发酵产胞外多糖用。

1.2 方法

1.2.1 发酵:采用摇瓶培养法。在500mL三角

瓶中装入100mL液体培养基,灭菌后接菌,在一定转速、温度下摇瓶培养。

1.2.2 分离:将发酵液用3倍体积的蒸馏水稀释,10000r/min离心30min除菌体,上清液用2倍体积的异丙醇沉淀,沉淀物在60℃烘干6h后称重,胞外多糖产量(产胶量)为gEPS/L发酵液;离心沉淀物水洗3次,用0.22 μm 微孔滤膜过滤后90℃烘干至恒重,称重为菌体干重,生物量即为g菌体干重/L发酵液。

1.2.3 生长曲线测定:按1%接菌量加入菌液后,置恒温摇床150r/min振荡培养48h,每隔2h取样分别测定其透光率(T_{640})和pH,绘制 T_{640} 、pH与时间(h)关系曲线。

1.2.4 pH测定:见参考文献[3]。

1.2.5 粘度测定:见参考文献[3]。

1.2.6 残糖测定:苯酚-硫酸法^[4]。蔗糖的最大吸收峰在492nm处。标准曲线回归方程: $Y = 1.32375X - 0.13$ 。

1.2.7 溶氧系数测定:用结凝胶配成一定粘度的液体模拟发酵液。按文献方法[5]测定一系列粘度在150、200、250、300r/min时的溶氧系数。据此作出溶氧系数为50L/h和100L/h时发

酵液粘度与转速的关系图。

2 结果与讨论

2.1 S1 菌的生长曲线

S1 菌的生长曲线见图 1。该菌生长的延迟期为 0~4h, 对数生长期为 4~12h, 平衡期为 12~24h。

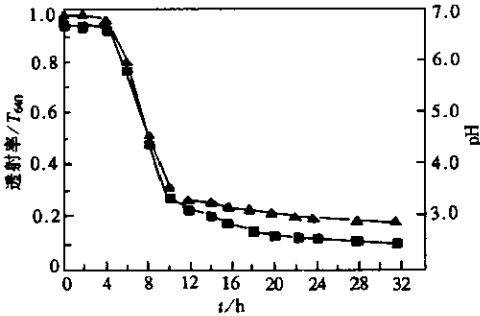


图1 S1菌在蔗糖中的生长曲线

—▲— T_{640} , —■— pH

2.2 碳源的选择及添加方式

2.2.1 不同碳源的影响: 分别以葡萄糖、蔗糖、乳糖和玉米淀粉为碳源, 研究不同碳源对 S1 菌菌体生长及产胞外多糖的影响, 结果表明: 以葡萄糖或蔗糖为碳源, 发酵液中生物量较多, 菌体生长较好, 蔗糖浓度为 30g/L, 葡萄糖浓度为 20~40g/L 时, 菌体生长最好, 生物量最高; 乳糖一般; 淀粉产生的生物量极少, 几乎没有增量, 说明该菌水解淀粉的能力弱。从产胶量来看(图 2), 蔗糖浓度为 30~60g/L, 葡萄糖浓度为 40~50g/L 时, 产胶量较高, 达 3.45~3.75g/L; 乳糖的产胶量一般, 最高为 2.12g/L; 因菌体对淀粉的利用率低, 且淀粉对沉淀干扰很大, 无法测出其产胶量。从菌体的产胶率 $Y_{p/x}$ (gEPS/g 菌体干重) 来看, 也以葡萄糖和蔗糖的为高, 蔗糖浓度为 40~50g/L 时, 产胶率为 2.04~2.06, 葡萄糖浓度为 50g/L 时, 产胶率为 1.96, 而乳糖最高为 1.20。

2.2.2 碳源添加方式的影响: 比较了一步和第二步加糖法对 S1 菌菌体生长及产胞外多糖的影响, 结果表明: 第二步加糖法的产胶率为 3.145, 明显高于一步加糖法的 2.110 ($P < 0.005$); 第二步加

糖法发酵液的平均粘度为 3800mPa·s, 也明显大于一步加糖法的 2100mPa·s ($P < 0.005$); 使用 1% 葡萄糖的发酵液的产胶率为 3.065, 低于 1% 蔗糖的 3.225 ($P < 0.05$); 补加 4% 蔗糖的平均产胶率为 3.450, 则高于 4% 葡萄糖的 2.840 ($P < 0.005$)。因此, 可采用初期 1% 蔗糖, 发酵 12h 后补加 4% 的蔗糖的二步加糖法进行 S1 菌的胞外多糖发酵生产。

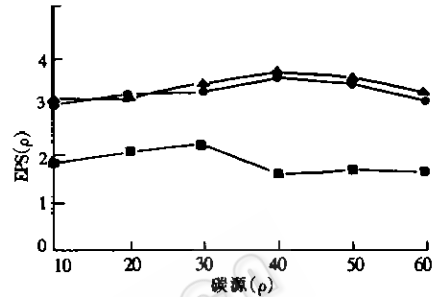


图2 碳源对S1菌产胶量的影响

—▲— 蔗糖, —●— 葡萄糖, —■— 乳糖

2.3 氮源的选择及碳氮比

2.3.1 氮源种类的选择: 选择 NH_4NO_3 (含氮量 35.00%)、 KNO_3 (3.80%)、尿素 (47.00%)、蛋白胨 (16.03%)、酵母膏 (8.93%)、牛肉膏 (12.00%) 作为供试氮源, 结果表明(图 3); NH_4NO_3 为 S1 菌的最佳氮源, 尿素、蛋白胨、牛肉膏的产胶率和粘度相差不大, 酵母膏最差。发酵过程中发现有机氮源对促进菌体生长较好, 但发酵后期出现很多泡沫, 以酵母膏最多, 这可能是其产胶率不高的原因。无机氮源的发酵液中几乎没有泡沫, 因此 S1 菌的胞外多糖发酵最好采用 NH_4NO_3 。

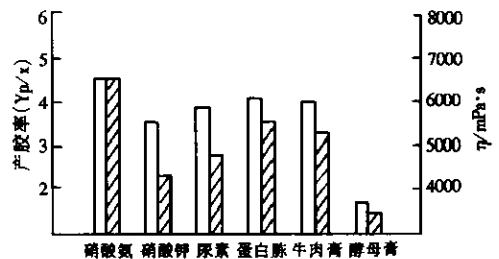


图3 氮源对S1菌产胶的影响

▨ 粘度, □ $Y_{p/x}$

2.3.2 不同碳氮比的影响: 研究了碳氮比为

30:1、60:1、90:1、120:1及150:1对S1菌的生物量、粘度及产胶量的影响。结果表明:随碳氮比的增大,发酵液中的生物量减少,产胶量增多,粘度随之增大,但一定程度后,发酵液中的生物量、产胶量和粘度均减少。S1菌适宜的碳氮比为120:1。

2.4 无机离子的影响

不同浓度的 KH_2PO_4 对产胶量和粘度的影响较大,加入0.5g/L KH_2PO_4 ,产胶量大,发酵液粘度也大,但 KH_2PO_4 的浓度增加到1.5g/L时,产胶量反低于空白样。磷酸盐含量高时,结合到多糖分子上,导致产胶量下降^[6]。加入 MnSO_4 、 MgSO_4 的产胶量和粘度比空白样高,0.1g/L MgSO_4 或0.3g/L MnSO_4 的产胶量最高,粘度最大。对于 CaCl_2 ,随加入量的增大,发酵液的粘度也随之增高,最高达12000mPa·s,但产胶量并未明显增加。因此培养基中 Ca^{2+} 的浓度应最低。

2.5 温度的影响

随温度升高(21℃~33℃),发酵液中生物量增大,菌体在较高温度下生长好(图4);温度为25℃时,产胶量最大,为7.58,粘度达12000mPa·s;21℃、25℃、29℃、33℃的产胶率分别为2.76、3.38、2.48、1.08,较低温度(21℃~25℃)下的产胶率高于较高温度(29℃~33℃)下的产胶率。因此,发酵温度第一阶段可采用33℃~35℃,第二阶段24℃~25℃。

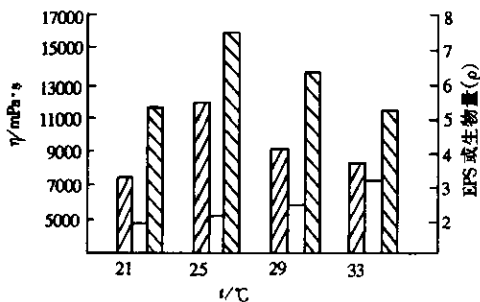


图4 温度对S1菌生长及产胶的影响

▨ 粘度, □ 生物量, ▤ EPS

2.6 pH的影响

pH可影响微生物细胞的代谢途径^[3]。随pH增高,发酵液生物量也随之增加,pH为

7.2时,生物量最多;pH为6.5时,产胶量最高,达8.56g/L,发酵液粘度达34000mPa·s;pH为8.0时,菌体几乎不生长,也不产胶。因此,发酵第一阶段应控制 $\text{pH}7.2 \pm 0.1$;第二阶段 $\text{pH}6.5 \pm 0.1$ 。

2.7 溶氧的影响

溶氧系数为50L/h和100L/h时,菌体生长较好,发酵液粘度分别为37500mPa·s和45000mPa·s,产胶量分别为8.76g/L和8.98g/L,表明高溶氧对S1菌的生长和产胶有利。

2.8 表面活性剂的影响

表面活性剂可影响脂类代谢,提高细胞膜的通透性^[7]。表面活性剂对发酵产胶也有影响。加入土温40和土温80后的产胶量比空白样高,土温80比土温40效果好,以0.02g/L土温80效果最好。

3 结论

少动鞘脂单胞菌的发酵产胶工艺可采用二步发酵法。发酵培养基及工艺参数为:

第一阶段:蔗糖1%, NH_4NO_3 0.05%, KH_2PO_4 0.05%, MnSO_4 0.03%, MgSO_4 0.01%,吐温80 0.002%, $\text{pH}7.2 \pm 0.1$,温度33℃~35℃,高溶氧(激烈振荡)。

第二阶段,发酵10~12h后,补加蔗糖40g/L,温度24℃~25℃, $\text{pH}6.5 \pm 0.1$,高溶氧。

S1菌的胞外多糖产量最高可达8.98g/L,发酵液粘度最高可达45000mPa·s。

参 考 文 献

- [1] 淡家林. 微生物学通报, 1988, 15(1): 35~37.
- [2] Pszczola D E. Food Technology, 1993, 47(9):94~96.
- [3] Esgalhado M E. Process Biochemistry, 1995, 30(7): 667~671.
- [4] Dubis M. Analytical chemistry, 1956, 28:350~356.
- [5] 高建伟. 生化工程实验. 广州:华南理工大学出版社, 1988.
- [6] Souw P. Appl. Environ. Microbiol., 1979, 37:1186~1192.
- [7] Gliendo E. Enzyme and Microbial Technology, 1996, 19:145~149.