

耐氨固氮的催婉克氏菌的高密度培养研究*

卢秋雁·谢小保 朱红惠 邱晓颖 丘明祺 丘元盛

(广东省微生物研究所 广州 510070)

摘要: 根据耐氨固氮型催婉克氏菌的特点, 对其发酵工艺进行了研究。确定了以葡萄糖为碳源, 合理搭配适量的氮源及无机盐作为高密度培养的基础培养基; 在培养的中后期, 添加葡萄糖补充碳源, 流加氨水补充氮源, 同时将 pH 值稳定在 6.5~6.8 之间, 通过控制适当的通气量、搅拌速度以维持适当的溶氧水平。培养终止时, NG13/pMC73A 的菌数达到 $600 \sim 700 \times 10^8$ cfu/mL, 与原有工艺相比, 菌数提高十倍以上, 而培养周期基本相同。

关键词: 催婉克氏菌, 高密度培养

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 02-0042-04

STUDY ON HIGH-DENSITY CULTURE OF AMMONIUM-RESISTANT N₂-FIXING BACTERIUM *KLEBSIELLA OXYTOCA*

LU Qiu-Yan XIE Xiao-Bao ZHU Hong-Hui QIU Xiao-Ying QIU Ming-Qi QIU Yuan-SHeng
(Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070)

Abstract: Based on the physiological properties of ammonium-resistant N₂-fixing bacterium (*Klebsiella oxytoca* NG13/pMC73A), the fermentation technology of it was studied. The basic medium of high-density culture was established, with glucose as carbon source coupled with appropriate nitrogen source and inorganic salts. At the middle and late phase of culture, glucose and ammonia were added to supply carbon source and nitrogen source, stabilizing the pH

* 国家 863 计划资助项目 (No. 101-03-04-01)

Project Granted by Chinese National Programs for Science and Technology Development (No. 101-03-04-01)

收稿日期: 2001-04-25, 修回日期: 2001-07-10

at 6.5 ~ 6.8. Optimal level of dissolved oxygen was kept by controlling aeration and stirring rate. Bacterium number of *Klebsiella oxytoca* NG13/pMC73A reached $600 \sim 700 \times 10^8$ cfu/mL at the end of culture. Compared with previous technology, bacterium number was increased by more than ten-fold with a comparable culture period.

Key words: *Klebsiella oxytoca*, High-density culture

耐氨固氮型催婉克氏菌 (*Klebsiella oxytoca* NG13/pMC73A) 以及耐氨固氮型阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae* E26/pMC73A) 都是采用生物技术选育的新型固氮菌。田间应用试验表明, 水稻、甘蔗、蔬菜等作物施用耐氨固氮菌后, 有明显的增产效果和氮素效益^[1]。作为一项农业新技术, 具有很大的推广应用潜力。

实现高密度、高产率和高浓度培养是近几年发酵工业的目标和方向^[2]。微生物的高密度培养技术应用在重组大肠杆菌、酵母菌的发酵, 取得了较好的效果^[3~5]。耐氨固氮菌在田间应用推广多年, 原有的菌剂生产方法虽然工艺简便, 成本低廉, 但所获得的菌液含菌量不高, 仅有 $10 \sim 40 \times 10^8$ cfu/mL。为了提高菌数, 我们从改进培养基配方出发, 经过反复筛选确定以葡萄糖为碳源, 配以适量的氮源及无机盐作为高密度培养的基础培养基, 使菌数提高到 200×10^8 cfu/mL; 进而通过对其培养过程的工艺条件进行探索改进, 使菌数提高到 $600 \sim 700 \times 10^8$ cfu/mL。高密度菌液稀释后, 其使用效果与原有工艺生产的菌液相似。因此, 采用高密度培养进行耐氨固氮菌生产, 能缩小生物反应器的容积, 减少设备的投资及能源的消耗, 降低生产成本, 从而取得较好的经济效益。本文着重对耐氨固氮的催婉克氏菌培养过程中碳氮源的供给, 溶氧条件, pH 控制等方面进行试验研究, 探讨最佳培养条件, 从而获得高密度的菌液。

1 材料与方法

1.1 菌种

耐氨型催婉克氏菌 (*Klebsiella oxytoca* NG13/pMC73A)。

1.2 发酵罐

德国 BIOSTAR[®] TB 型 5L 罐 (自动控制装置)。

1.3 培养基组分

葡萄糖、蔗糖、蛋白胨、酵母膏、磷酸氢二铵、硫酸铵、尿素、氯化钠、磷酸氢二钾、硫酸镁、微量元素等, 根据需要进行组合。

补料: 40% 葡萄糖溶液, 12N 氨水。

1.4 溶氧的测定

配料后将溶氧电极与发酵罐接通, 用无氧水校正溶氧电极为 0, 消毒结束后, 控制罐温为 30℃, 将空气流量和搅拌速度分别调到 130L/h 和 1100r/min (两者均为本批的最高水平)。待溶氧电极显示稳定后, 核定此时溶氧为 100%, 溶氧电极即可投入使用。

1.5 pH 电极的校正

配料前将传感系统 pH 电极接通, 用标准 pH 试液校正后方可使用。

1.6 发酵方法

取以活化好的斜面接种到备有 100mL LB 培养基的 500mL 三角瓶中, 加氨苄青霉素及硫酸卡那霉素各 50μg/mL, 30℃, 180r/min 旋转式摇床振荡培养 15h。

上述菌液培养好后, 接种到发酵培养基中, 控制起始 pH7.0 ~ 7.2, 培养温度 30℃, 搅拌速度 500r/min, 8h 以后将搅拌速度逐渐提高直至达到最高转速 1100r/min, 通气量

130L/h。培养进行到约9h左右,流加氨水控制pH,葡萄糖分多次间歇式添加。

2 结果与讨论

2.1 高密培养基的选择

如图1所示,用3种不同培养基配方进行常规培养时菌的生长曲线,所获得的菌数以改良2配方培养为最高,此培养基中所含的无机盐已足够用于高密度培养,中途无须再添加,且碳氮源搭配简单,在培养过程中易于控制,故最后决定以此作为高密度培养的培养基配方。

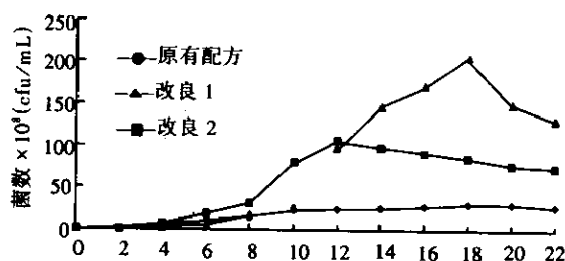


图1 3种培养基配方的比较图

2.2 高密度培养的营养供给

为了获得高密度的菌液,必须配以高浓度的培养基进行培养,但培养基浓度过高,对菌的生长起阻碍作用,为了避免这种情况,我们选用适当浓度的培养基作为基础培养基,然后在培养中途适时补充适量营养物质。葡萄糖初始浓度为20g/L,培养到9h,还原糖下降至

0.5%左右开始添加葡萄糖,约2h添加一次,添加量以不超过2%为宜。通过用氨水调pH的同时得以适当补充氮源。

2.3 pH对高密度培养的影响

NG13/pMC73A在密度培养时,葡萄糖的不断添加,会引起糖酵解的速度和代谢产物氧化的速率不平衡,这种不平衡的结果会导致有机酸的产生和堆积,pH可降低到5.5以下,不利于NG13/pMC73A的高速生长。我们通过自动流加氨水,分别将培养液的pH控制在6.5、6.8、7.0,所获得菌液的菌数都比不控制pH的高,以pH6.8时生长最好,同时,氨水也可作为氮源的补充。

2.4 溶氧对NG13/pMC73A生长的影响

NG13/pMC73A属兼性好氧菌,在生长繁殖过程中,需要消耗氧。在培养基、发酵罐结构、搅拌速度固定的条件下,培养基的溶氧与通气量有关。在发酵的前期和对数生长期,保证适当的通气量很重要,通气量过小和过大,对菌的生长影响很大。在现有实验条件下,进行高密度培养时,通过提高搅拌转速、通气量、罐压等措施来增加溶氧,但仍不能满足要求,从而限制了菌液密度的进一步提高。

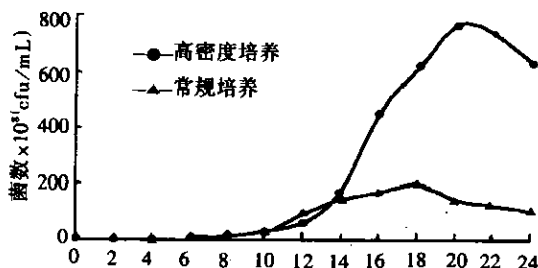


图2 高密度培养与常规培养的比较菌数

2.5 高密度培养与常规培养的比较

图2为两种培养过程菌数增长的曲线图。高密度培养周期为20h,与常规培养工艺的周期相似,但最高菌数可由 200×10^8 cfu/mL提高到 780×10^8 cfu/mL。

3 结论

研究结果表明,适当的碳源、氮源以及无机盐浓度是密度培养的先决条件,而pH、通气量以及溶氧是提高发酵菌数的重要因素,用改进的工艺条件进行高密发酵培养,不仅可以大幅度提高菌液密度,菌数

由原来的 $10 \sim 40 \times 10^8 \text{ cfu/mL}$ 提高到 $600 \sim 700 \times 10^8 \text{ cfu/mL}$, 而且不影响耐氨型固氮菌的生长代谢过程。高密培养稀释后的菌液并不影响其对农作物的增产效果。

参 考 文 献

- [1] 丘元盛. 耐氨固氮菌的应用, 海峡两岸农业科技发展研讨会论文, 广州: 暨南大学出版社, 1997, 153 ~ 156.
- [2] Park C H, And Geng. Q H. Sep. And Purif. Methods. 12, 21 (2): 127.
- [3] 高桥穰二. パイオサイエンスとインダストリー, 1992, 50 (11): 31 ~ 34.
- [4] 朱 明, 李 晶, 陈执中. 药物生物技术, 1997, 4 (1): 13 ~ 16.
- [5] 陈洪章, 李佐虎. 工业微生物, 1998, 28 (1): 28 ~ 31.