

黄单胞菌多糖发酵中试*

王修垣 崔文华 刘秀芳

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*) L4 在两吨发酵罐中, 以蔗糖为底物发酵 72h, 发酵液粘度达到 6000~12000cp, 转化率平均达到 62.45%。

关键词 黄单胞菌多糖发酵, 野油菜黄单胞菌

我国从 60 年代开始研究微生物胞外多糖在石油工业中的应用^[1], 已发表的关于黄单胞菌胶的研制报告都是以淀粉为底物的^[2,3]。考虑到以淀粉为底物, 在后处理过程中会发生产物和残余淀粉的共沉淀, 对产品质量有一定影响, 我们进行了以蔗糖为底物生产黄单胞菌胶的研究; 从萝卜黑心中分离到几十株菌, 从中筛选到一株以蔗糖为底物产生发酵液粘度和多糖量都较高的菌株 L4^[4], 并用该菌株完成了两吨罐中试, 结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 菌种

菌株 L4 分离自带有黑色病斑的萝卜中, 鉴定为野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*) L4^[4]。

1.2 工艺流程

斜面菌种→茄子瓶→200L 种子罐→发酵罐→放罐→溶剂提取→干燥→粉碎→80 目筛选→成品。

1.3 种子

1.3.1 斜面种子和茄子瓶种子培养基为马铃薯琼脂。

1.3.2 200L 种子罐: 为不锈钢通用式, 装料 120~130L, 灭菌 120℃ 40min。冷却后接入茄子瓶种子 15~20 只, 28~30℃、通气量: 1: 0.5~1.0, 200r/min 机械搅拌, 24~36h 按 5% 左右的接种量转入两吨罐。

1.4 发酵

罐体为不锈钢材料, 装料 1.3 吨。180r/min 机械搅拌, 通气量 1: 0.5~1.0, 温度 28~30℃。

种子罐和两吨罐装料组份与文献[5]基本相同, 豆油作消泡剂, 灭菌前 pH7.2。

1.5 分析、测定方法

发酵液的粘度用旋转粘度计在 45℃ 下测定。发酵液的多糖用工业乙醇沉淀, 再用 95% 的乙醇洗涤, 于 60~70℃ 烘箱烘干至恒重。细胞氮用克氏定氮法、无机氮用还原法^[6]和直接蒸馏克氏定氮法测定。蔗糖含量在用乙醇沉淀多糖后离心, 取上清液用 3, 5-二硝基水杨酸法^[7]分析。

2 结果和讨论

图 1 的资料表明, 两吨罐接种后, 细菌繁殖迅速, 氮源至 24~32h 大量消耗, 细胞蛋白量达到最高。多糖的合成在 16h 后显著增加, 表现为蔗糖量明显下降, 发酵液粘度明显提高, 至 64h 后达到最高点——8300cp。pH 从发酵初期的 8.5 降至 6.0 以下。从上述变化动态可以看出, 在 72h 终止发酵是适宜的。

发酵结束, 加热至 75℃、20min 放罐。发酵液加入 1: 0.8 的酒精提取多糖, 再以 1: 0.2

* 协作单位: 河南省科学院生物研究所, 河南省虞城县酶制剂厂

“七五”国家重点科技攻关项目的部分内容
1996-02-03 收稿

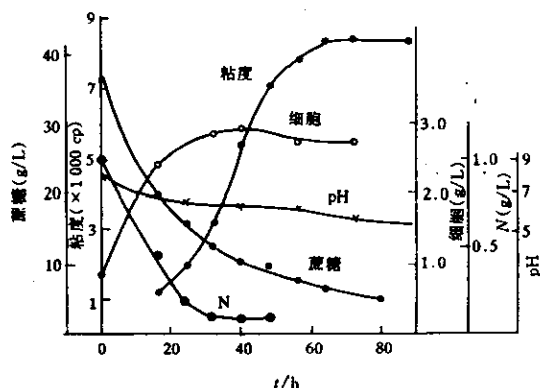


图1 L4菌株两吨罐多糖发酵的动态

表1 L4菌株产多糖两吨罐发酵结果

批 次	装料 (吨)	蔗糖 (kg)	发酵时间 (h)	发酵液粘度 (cp)	多糖产量 ³⁾ (kg)	转化率 (%)
1	1.3	52	72	65450 ¹⁾	32.7	62.9
2	1.3	52	72	62100 ¹⁾	32.5	62.6
3	1.3	52	72	68450 ¹⁾	33.3	64.0
4	1.3	47.4	72	8340 ²⁾	30.1	63.5
5	1.3	52	72	8700 ²⁾	30.8	59.2

1) 用国产旋转粘度计测得, 相当于 Brookfield 粘度计测定结果 11000~12000cp

2) 用 Brookfield 粘度计 4 号转子 30r/min 测定

3) 多糖产量已减去其中含有的细胞蛋白量

的酒精洗涤后压榨, 置 50℃ 下烘干, 称重, 制粉, 粒度约 60~80 目。

五批两吨罐的结果见表 1, 从中可以看出, 菌株 L4 在两吨罐中发酵 72h, 发酵液粘度在 8000cp 以上, 最高达到 12000cp, 多糖产量对底物的转化率为 59.2%~64.0%, 平均为 62.45%, 达到了国际上该多糖的生产水平^[8,9], 为该多糖的投产奠定了良好的基础。

参考文献

- [1] 王修垣. 石油微生物学在中国的发展. 见: 张树政, 王修垣主编. 工业微生物学成就. 北京: 科学出版社, 1988, 145~162.
- [2] 赵大健, 刁虎欣, 刘为林等. 工业微生物, 1986, 16(3): 11~20.
- [3] 江伯英, 王绮文, 吴珊根等. 山东大学学报(自然科学版), 1988, 23(3): 113~119.
- [4] 刘秀芳, 王修垣, 崔文华等. 微生物学报, 1991, 31(1): 75~81.
- [5] 刘秀芳, 王修垣. 微生物学报, 1993, 33(1): 40~47.
- [6] 中国医学科学院卫生研究所. 水质分析方法. 北京: 人民卫生出版社, 1974, 148~153.
- [7] Miller G L. Anal Chem, 1959, 31(3): 426~428.
- [8] Slodki M E, Cadmus M C. Adv in Appl Microbiology, 1978, 23: 19~54.
- [9] Kennedy J F, Bradshaw I J. Progress in Industrial Microbiology, 1984, 19: 319~372.

PILOT TESTS OF XANTHAN FERMENTATION

Wang Xiuyuan Cui Wenhua Liu Xiufang

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract Xanthan production from sucrose by *Xanthomonas campestris* L4 was carried out in a fermenter with a capacity of two tons. At 72h after inoculation, the viscosity of fermented broth reached to 6000~12000cp. The conversion rate of added sucrose was about 62.45% in average of 5 batches.

Key words Xanthan fermentation, *Xanthomonas campestris*