

鞘氨醇单胞菌 TP-3 合成新型生物聚合物 Ss 的发酵条件优化

黄海东^{1,2} 王 薇¹ 马 挺¹ 张 禹³ 张国沛³ 李国强¹ 梁凤来¹ 刘如林^{1*}

(1. 南开大学 生命科学学院 分子微生物学与技术教育部重点实验室 天津 300071)

(2. 天津农学院 农学系 天津 300384)

(3. 鑫合生物化工有限公司 河北 新河 055650)

摘 要: 鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas* sp.)TP-3 能合成一种具有增稠性、假塑性、成凝胶特性和乳化性能的新型生物聚合物Ss。运用单因素实验和均匀设计法对菌株TP-3 合成聚合物Ss的发酵条件进行优化, 实验结果表明, 培养基组成为葡萄糖 41.2 g/L, 豆饼粉 2.0 g/L, NaCl 0.85 g/L, K₂HPO₄ 1.46 g/L, MgSO₄ 0.12 g/L, MnCl₂ 0.0075 g/L, FeSO₄ 0.002 g/L, 初始pH为 7.0, 在 27°C, 180 r/min 的条件下摇床培养 60 h, 聚合物 Ss 的产量达到 21.5 g/L。该聚合物生产成本低, 在油田开发中极具应用前景。

关键词: 鞘氨醇单胞菌, 生物聚合物, 发酵条件, 均匀设计

Optimization of Culture Condition for Novel Biopolymer Ss Production by *Sphingomonas* sp. Strain TP-3

HUANG Hai-Dong^{1,2} WANG Wei¹ MA Ting¹ ZHANG Yv³ ZHANG Guo-Pei³
LI Guo-Qiang¹ LIANG Feng-Lai¹ LIU Ru-Lin^{1*}

(1. Key Laboratory of Molecular Microbiology Technology, Ministry of Education, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

(2. Department of Agronomy, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

(3. Xinhe Biochemical Co. Ltd, Xinhe, Hebei 055650, China)

Abstract: *Sphingomonas* sp. TP-3 synthesizes a type of novel biopolymer Ss with properties of thickening, pseudoplastic, gelling and emulsification. Both single factor experiments and uniform design were employed in this study to optimize fermentation conditions of strain TP-3. The optimal fermentation parameters in shaking flask were as follow: glucose 41.2 g/L, soybean meal 2.0 g/L, NaCl 0.85 g/L, K₂HPO₄ 1.46 g/L, MgSO₄ 0.12 g/L, MnCl₂ 0.0075 g/L, FeSO₄ 0.002 g/L, initial pH 7.0, culture temperature 27°C, rotating speed 180 r/min. The yield of biopolymer Ss reached 21.5 g/L. As a low-cost biopolymer, Ss has wide prospect for application in oil recovery.

Keywords: *Sphingomonas* sp., Biopolymer, Fermentation conditions, Uniform design

自然界中的许多微生物都具有合成生物聚合物的能力,这些聚合物粘附在细胞表面或以不定形粘液状分泌到培养液中。一些生物聚合物已经成为重要的生物技术产品,例如甘蓝黑腐病黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*)合成的黄原胶和鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas* sp.)合成的鞘多糖类聚合物已作为增稠剂、稳定剂、乳化剂和胶凝剂,广泛应用于石油、化工、制药和食品等多个领域^[1-5]。

菌株TP-3能够大量合成一种由糖肽脂组成的新型生物聚合物Ss,这种聚合物具有良好的增稠性、假塑性、成凝胶特性和乳化性能^[6]。与鞘氨醇单胞菌鞘多糖的最大区别在于可酸沉提取,而非用乙醇沉淀提取,因此可以大幅度降低生产成本。Ss属于一种全新的生物聚合物,可用于油田的稠化水驱油、油藏封堵及钻井泥浆的配制。本文通过单因素实验和均匀设计法对菌株TP-3合成聚合物Ss的发酵条件进行了优化。

1 材料和方法

1.1 菌种

菌株TP-3由本室鉴定并保藏。

1.2 培养基和培养条件

斜面培养基(g/L):蔗糖 10,蛋白胨 2,牛肉膏 1,琼脂 15, pH 7.0~7.5。

种子培养基(g/L):蔗糖 10,蛋白胨 0.5,酵母粉 0.1, NaCl 0.2, pH 7.0~7.5。

发酵培养基(g/L):蔗糖 40,蛋白胨 2, K₂HPO₄ 0.3, NaCl 0.1, pH 7.0~7.5。

摇瓶发酵条件:250 mL三角瓶装100 mL种子培养基,接种后置于旋转式摇床上培养24 h(180 r/min, 30°C)得种子液。250 mL三角瓶装90 mL发酵培养基,灭菌后接入10 mL种子液,置于旋转式摇床上培养72 h(180 r/min, 30°C)后进行产物提取。

1.3 菌株TP-3的分类鉴定

在光学显微镜和电子透射显微镜下观察细胞个体形态,并测量菌体大小。细菌的革兰氏染色、芽孢染色及生理生化鉴定参考文献^[7]进行。扩增菌株TP-3的16S rDNA,进行序列测定和系统进化分析^[8],并测定细胞的呼吸醌和极性脂类型等化学分类指标^[9,10]。

1.4 菌株碳源利用范围测定

用Biolog细菌自动鉴定仪进行菌株的碳源利

用鉴定,GN微板的95个样品孔中各含有不同碳源,对照孔不含任何碳源,每孔接种125 μL菌株TP-3的稀释培养物,培养24 h以后测定代谢指数。

1.5 发酵指标测定及生物聚合物Ss的提取纯化

发酵液粘度测定:用Brookfield LVDV-2型旋转粘度计于25°C,4号转子测定。

发酵液残糖测定:用SBA-40C型葡萄糖生物传感分析仪测定。

产物的提取及纯化:将发酵液于100°C加热30 min,用去离子水稀释10倍,10000 r/min离心40 min除菌体,收集上清液,重复几次至镜检无菌体,合并上清液,使用Sevag法除蛋白,调pH至3.0左右沉淀聚合物Ss,透析至pH中性,用sephacryl s-400凝胶色谱柱进一步纯化,去离子水洗脱,waters 410视差折光检测器示踪,收集、冻干得聚合物Ss。称重计算聚合物产量,与发酵培养基中的糖加入量相比,计算糖转化率。

1.6 发酵条件的单因素实验

碳氮源实验:除碳源或氮源不同外,其余成分与原发酵培养基相同。

无机盐和微量元素实验:在优化碳氮源后的培养基中增加不同种类和浓度的无机盐和微量元素。

在优化培养基组分的基础上研究菌株TP-3合成聚合物Ss的最适培养温度、最适初始pH、最适摇床转速、最适装液量及发酵周期。

1.7 发酵培养基优化实验设计

在单因素实验的基础上,用软件DPS v3.01的实验设计功能,以均匀设计确定培养基各组分的配比,并利用软件的多元分析功能进行实验数据分析。

2 结果与讨论

2.1 菌株TP-3的分类鉴定

菌株TP-3的细胞形态为杆状,在培养初期菌体分裂后不断开,形成长杆状,随着时间的增加,形成分散的单个细胞,大小(1.0 μm~1.5 μm)×(1.8 μm~2.4 μm),菌体周围有明显的纤毛状聚合物分泌(图1)。革兰氏染色阴性,无芽孢、未见鞭毛,胞内有异染粒、无类脂颗粒,抗酸染色阳性。

生理生化鉴定实验表明:菌株TP-3氧化酶阴性,接触酶阳性,脲酶阴性,水解明胶和七叶苷,不水解淀粉,吲哚和H₂S产生试验为阴性,M.R和V.P试

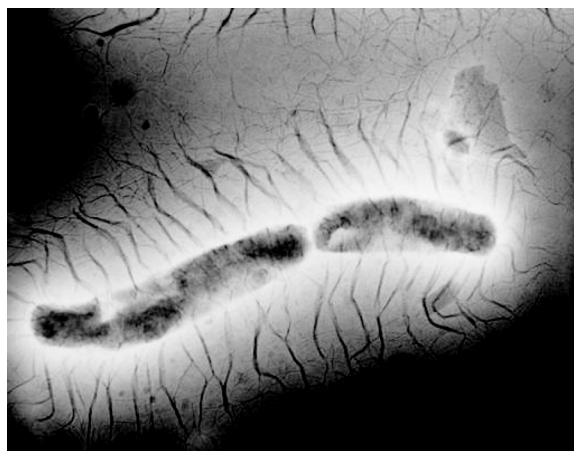


图1 菌株 TP-3 在透射电镜下的细胞形态(14500×)
Fig. 1 Cell morphology of strain TP-3 under trans-electron microscope(14500 ×)

验阴性,硝酸盐还原阳性,亚硝酸盐还原和反硝化阴性。化学分类实验表明:TP-3的极性脂组分中含有鞘氨醇单胞菌属的特征性物质-鞘糖脂^[4],其呼吸醌种类为Q-10。

PCR 扩增得到菌株 TP-3 的 16S rDNA 片段,经 DNA 测序长度为 1480 bp,在 GenBank/EMBL/DDBJ 中的序列登录号为 DQ789172,在 GenBank 数据库中 Blast 比对表明,用邻位相连法构建系统进化树(图 2),菌株 TP-3 与 *Sphingomonas* sp. 菌株的最高同源性为 95.9%,一般情况下,16S rDNA 的同源性小于 98%,可以认为同属不同种,根据以上数据判断 TP-3 是鞘氨醇单胞菌的一个新种。

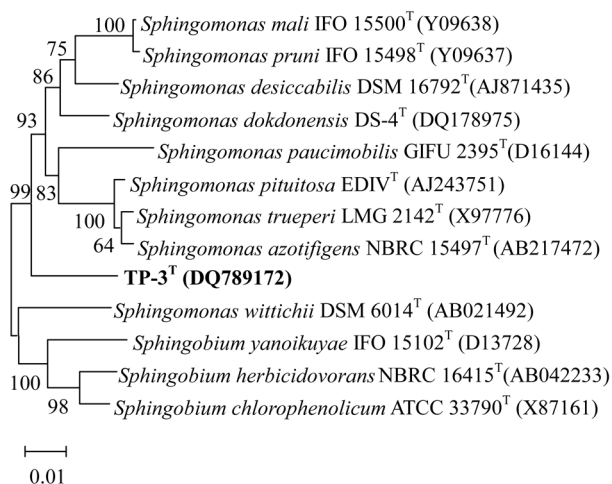


图2 菌株 TP-3 的 16S rDNA 序列系统进化树
Fig. 2 Phylogenetic tree of TP-3 16S rDNA sequences

2.2 碳源对聚合物合成的影响

Biolog 分析结果表明,菌株 TP-3 不能水解淀粉,可利用的碳源有糊精、蔗糖、葡萄糖、半乳糖等。利用不同种类碳源进行发酵实验,结果(图 3)表明 TP-3 利用糊精为碳源时生长缓慢,聚合物 Ss 产量最低;以葡萄糖为碳源时发酵液的粘度和聚合物产量最高,20 g/L~60 g/L 的葡萄糖浓度梯度实验表明,选择 40 g/L 浓度的葡萄糖用量,能得到较高的产物量和糖转化率。

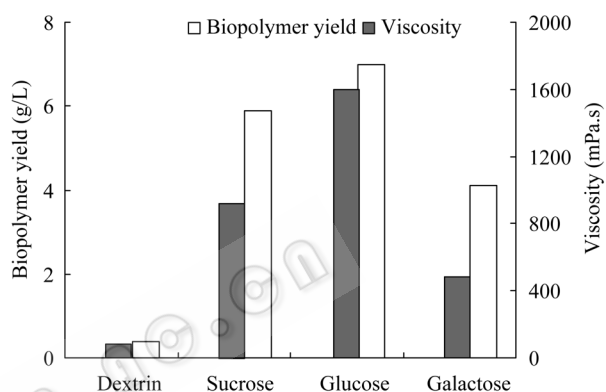


图3 碳源对聚合物合成的影响
Fig. 3 Effect of carbon source on biopolymer

2.3 氮源对聚合物合成的影响

比较了几种有机和无机氮源对菌株 TP-3 合成聚合物 Ss 的影响(图 4)。使用无机氮源时,TP-3 在培养初期生长速度较快,但最终的发酵液粘度和产物量较低。有机氮源中蛋白胨效果较差,豆饼粉为最佳氮源,1 g/L~4 g/L 浓度梯度实验表明,最佳的豆饼粉用量为 2.5 g/L。

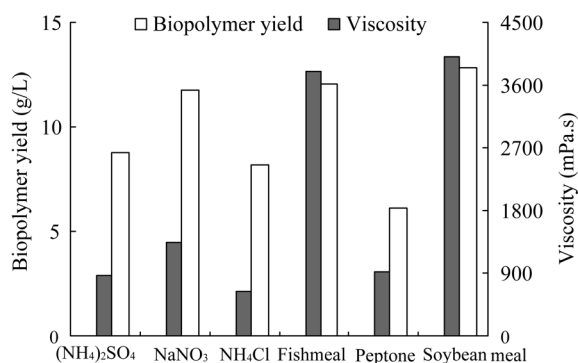


图4 氮源对聚合物合成的影响
Fig. 4 Effect of nitrogen source on biopolymer

2.4 无机盐和微量元素对聚合物合成的影响

以葡萄糖为碳源, 豆饼粉为氮源, 其他组分不变, 研究了在培养基中加入不同浓度磷酸盐 and 不同浓度梯度金属离子对聚合物Ss产量和发酵液粘度的影响, 实验结果见表 1, 表明在培养基中加入NaCl 0.5 g/L、K₂HPO₄ 1.6 g/L、MgSO₄ 0.2 g/L、MnCl₂ 0.004 g/L、FeSO₄ 0.005 g/L时聚合物Ss产量最高。

表 1 无机盐和微量元素对发酵的影响 Table 1 Effect of inorganic salts and trace elements on fermentation					
NaCl (g/L)	0	0.1	0.3	0.5	0.7
Ss 产量(g/L)	12.32	12.33	12.61	12.86	11.91
K ₂ HPO ₄ (g/L)	0	0.8	1.6	2.4	3.2
Ss 产量(g/L)	11.80	12.25	12.46	12.16	12.18
MgSO ₄ (g/L)	0	0.05	0.1	0.2	0.3
Ss 产量(g/L)	12.12	12.37	12.38	12.63	12.43
MnCl ₂ (g/L)	0	0.002	0.004	0.006	0.008
Ss 产量(g/L)	12.43	12.49	12.56	12.41	12.38
FeSO ₄ (g/L)	0	0.001	0.005	0.01	0.02
Ss 产量(g/L)	11.92	12.42	12.96	12.39	12.33

2.5 发酵条件对聚合物合成的影响

将培养基的初始 pH 分别调为 6.0、6.5、7.0、7.5 和 8.0, 进行发酵实验, 研究初始 pH 值对菌株 TP-3 合成聚合物 Ss 的影响, 结果见图 5, 在 pH 6.5~7.5 的范围内聚合物 Ss 产量均较高, 其中 7.0 为最适初始 pH。24℃~36℃ 的温度梯度实验(图 6)表明, 较低的发酵温度有利于聚合物的合成, 最适温度为 27℃。溶解氧不足是高粘度发酵产品产量提高的一个重要限制性因素, 实验表明摇床转速越高, 摇瓶的装液量越少, 菌株 TP-3 合成的聚合物产量越高, 考虑实验条件和检测指标方便, 采用 180 r/min 的摇床转速和 250 mL 摇瓶中 100 mL 的装液量。

单因素实验优化后的发酵培养基配方为: 葡萄糖 40 g/L, 豆饼粉 2.5 g/L, NaCl 0.5 g/L, K₂HPO₄ 1.6 g/L, MgSO₄ 0.2 g/L, MnCl₂ 0.004 g/L, FeSO₄ 0.005 g/L。初始pH 7.0, 发酵温度 27℃, 在该条件下测定了菌株TP-3 的最适发酵周期。结果表明, 培养到 58 h发酵液粘度最大, 达到 7460 mPa.s, 聚合物 Ss在 60 h的合成量最高达 14.2 g/L, 68 h培养基中的碳源葡萄糖完全耗尽, 因此最佳的发酵周期为 60 h。单因素实验优化后菌株TP-3 合成聚合物Ss的产量比原发酵条件下的 5.9 g/L提高 2.4 倍。

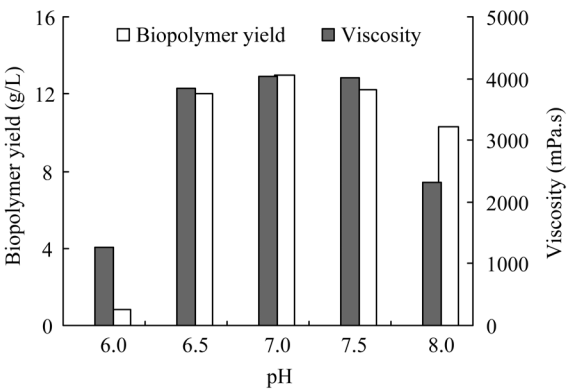


图 5 初始 pH 对聚合物合成的影响
Fig. 5 Effect of initial pH on biopolymer

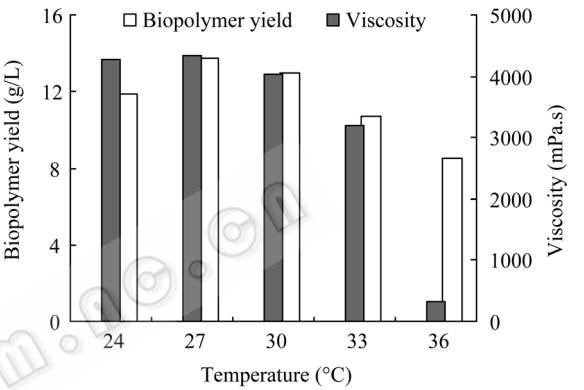


图 6 培养温度对聚合物合成的影响
Fig. 6 Effect of temperature on biopolymer

2.6 均匀设计法优化发酵培养基

根据单因素实验结果, 以葡萄糖、豆饼粉、NaCl、K₂HPO₄、MgSO₄、MnCl₂和FeSO₄ 为重点考察对象, 采用计算机多次运行寻优获得 7 因素 12 水平的均匀设计实验方案, 在初始pH 7.0, 装液量 100 mL/250 mL, 27℃, 180 r/min 的条件下, 摇床培养 60 h 测定聚合物 Ss 产量, 每种培养基配方进行 3 个平行实验, 结果见表 2。

用DPS软件对表 2 的数据进行二次多项式逐步回归分析, 得出聚合物产量与各因素关系的方程为: $Y=18.3567 + 0.1915X_4 - 0.0169X_4^2 + 0.0252X_1X_6 - 0.0163X_1X_7 - 0.0223X_2X_5 + 0.0070X_6X_7$, $F=28.368$, $R^2=0.986$, 显著水平 $P=0.001$, 剩余标准差 $s=0.252$, 回归方程显著。最优培养基配方为: 葡萄糖 41.2 g/L, 豆饼粉 2.0 g/L, NaCl 0.85 g/L, K₂HPO₄ 1.46g/L, MgSO₄ 0.12 g/L, MnCl₂ 0.0075 g/L, FeSO₄ 0.002 g/L, 预测聚合物Ss的最高产量为 22.3 g/L, 在该模型处做 3 次验证实验, 聚合物Ss的平均产量为 21.5 g/L,

表 2 均匀设计方案及实验结果
Table 2 Protocol of uniform design and experimental data

Run	X_1 葡萄糖(g/L)	X_2 豆饼粉(g/L)	X_3 NaCl (g/L)	X_4 K ₂ HPO ₄ (g/L)	X_5 MgSO ₄ (g/L)	X_6 MnCl ₂ (g/L)	X_7 FeSO ₄ (g/L)	Y 聚合物产量 (g/L)
1	40.6	2.9	0.65	1.7	0.34	0.0070	0.0040	18.4
2	40.8	2.5	0.80	2.1	0.24	0.0020	0.0045	17.0
3	40.2	3.1	0.70	1.0	0.20	0.0035	0.0065	17.2
4	41.2	2.7	0.45	1.4	0.28	0.0055	0.0075	17.9
5	39.0	2.8	0.50	1.6	0.14	0.0025	0.0055	18.8
6	39.6	2.1	0.75	1.8	0.30	0.0045	0.0070	18.2
7	39.8	2.6	0.85	1.3	0.12	0.0060	0.0035	19.1
8	39.4	3.0	0.40	2.0	0.22	0.0050	0.0025	17.7
9	40.4	2.3	0.30	1.9	0.16	0.0065	0.0060	19.9
10	39.2	2.2	0.55	1.1	0.26	0.0075	0.0050	19.4
11	41.0	2.0	0.60	1.5	0.18	0.0040	0.0020	19.9
12	40.0	2.4	0.35	1.2	0.32	0.0030	0.0030	17.5

和预测值基本一致。

3 结论

鞘氨醇单胞菌合成的鞘多糖类聚合物虽具有独特的理化特性, 但产率较低, 醇沉提取的费用较高, 而高昂的生产成本限制了鞘多糖的广泛应用。菌株 TP-3 是鞘氨醇单胞菌的一个新种, 它能够大量合成具有增稠性、假塑性、成凝胶特性和乳化性能的新型生物聚合物Ss, 与鞘多糖的最大区别在于其结构中含有 1.5%的氨基酸, 其中天冬氨酸和谷氨酸占 23.3%, 因此可酸沉提取, 而非用乙醇沉淀提取, 从而大幅度降低生产成本^[6]。通过单因素实验和均匀设计法对鞘氨醇单胞菌TP-3 合成生物聚合物Ss的发酵条件进行优化, 聚合物产量从 5.9 g/L提高到 21.5 g/L, 较原发酵条件下的产量提高 3.6 倍。较高的产率和酸沉法较低的提取成本使菌株TP-3 合成的生物聚合物Ss在油田开发中具有极高的应用价值。

参 考 文 献

[1] Janeyii W, Hsiufeng Y. Characterization and flocculating properties of an extracellular biopolymer produced from a

Bacillus subtilis DYU1 isolate. *Process Biochem*, 2007, **42**: 1114–1123.
[2] Soudmand A, Ayatollahi S, Mohabatkari H. The in situ microbial enhanced oil recovery in fractured porous media. *J Pet Sci Eng*, 2007, **58**: 161–172.
[3] Baird JK, Sandford PA, Cottrell IW. Industrial application of some new microbial polysaccharides. *Biotechnol*, 1983, **1**: 778–783.
[4] Banik RM, Kanari B, Upadhyay S. Exopolysaccharide of the gellan family: prospects and potential. *World J Microbiol Biotechnol*, 2000, **16**: 407–414.
[5] Pollock TJ. Gellan-related polysaccharides and the genus *Sphingomonas*. *J Gen Microbiol*, 1993, **139**: 1939–1945.
[6] 王 薇, 黄海东, 张 禹, 等. 一种新型生物聚合物 Ss 的流变学性质及成胶特性. *微生物学通报*, 2008, **35**(6): 866–871.
[7] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, pp.267–295.
[8] Francois J, Julie D. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci*, 1998, **23**: 403–405.
[9] Tindall BJ. Lipid composition of *Halobacterium lacusprofundi*. *FEMS Microbiol Lett*, 1990, **66**: 199–202.
[10] Busse HJ, Kämpfer P, Denner EBM. Chemotaxonomic characterisation of *Sphingomonas*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 1999, **23**: 242–251.