

# 一株寡营养细菌胞外多糖的摇瓶发酵研究\*

张雪梅<sup>1</sup> 潘惠霞<sup>2\*\*</sup> 程争鸣<sup>2</sup> 王纯利<sup>3</sup> 赵 莉<sup>2</sup>

(新疆畜牧科学院农业部家畜繁育生物技术重点开放实验室 乌鲁木齐 830000)<sup>1</sup>

(中国科学院新疆生态与地理研究所 乌鲁木齐 830011)<sup>2</sup> (新疆农业大学资源与环境学院 乌鲁木齐 830052)<sup>3</sup>

**摘要:** 从新疆的寡营养环境——古尔班通古特沙漠中分离到一株寡营养细菌 *Azotobacter* sp. (1~15mg 碳/L 培养基), 通过进行 *Azotobacter* sp. 菌的单因子优化培养基的试验、摇瓶培养工艺条件的优化试验(培养温度、培养时间、初始 pH 值、溶氧量), 确定了菌种生长与营养需求等主要因子与胞外多糖产量、粘度的关系。结果表明, 摇瓶发酵的最适宜条件为: 以蔗糖为碳源, 碳酸钙含量为 2g/L, 初始 pH 值为 7 左右, 种龄 72~84h, 磷酸二氢钾、硫酸镁的含量分别为 0.3 g/L、0.1 g/L, 接种体积分数 15%, 于 37℃ 摇瓶培养 72h, 250mL 摇瓶装液量为 50mL, 在适宜条件下粘多糖的产量最大可达到 1145.94μg/mL, 粘性可达 9200 mPa·s。

**关键词:** 寡营养细菌, 胞外多糖, 发酵

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2007) 01-0065-05

## Study on the Conditions for Shaking Flask Fermentation of the Exopolysaccharide Production from An Oligotrophic Bacteria\*

ZHANG Xue-Mei<sup>1</sup> PAN Hui-Xia<sup>2\*\*</sup> CHENG Zheng-Ming<sup>2</sup> WANG Chun-Li<sup>3</sup> ZHAO Li<sup>2</sup>

(Key Laboratory of Livestock Reproduction and Breeding Biotechnology of Ministry of Agriculture,

Xinjiang Academy of Animal Science, Urumqi 830000)<sup>1</sup>

(Xinjiang Institute of Ecology and Geography, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011)<sup>2</sup>

(College of Resource and Environment, Xinjiang Agriculture University, Urumqi 830052)<sup>3</sup>

**Abstract:** An oligotrophic bacteria was isolated from oligotrophic environment (Gurbantunggut desert) in Xinjiang. This paper had ascertained the relationship between the main factors such as strain growth, nutrition demand, and the yield and viscosity of extracellular polysaccharide (EPS) by carrying on the experiment of single factor optimized culture medium (C-source, inorganic salts, etc.); the experiment of optimized conditions for shaking culture (temperature, time, the initial pH, dissolve oxygen). The optimum conditions for exopolysaccharide production were as follows: using sucrose as the carbon source, CaCO<sub>3</sub> 2g/L, initial pH of 7, seed age of 72-84h, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3g/L, MgSO<sub>4</sub> 0.1g/L, inoculation quantity of 15%, cultivation 72h at 37℃, and 50 mL medium in a 250 mL flask. Under the optimal conditions, the yield of exopolysaccharide may reach 1145.94μg/mL, and the viscosity of fermenting liquor may reach 9200 mPa·s.

**key words:** Oligotrophic bacteria, Extracellular polysaccharide, Fermentation

微生物胞外多糖是某些细菌、真菌、蓝藻等微生物在代谢过程中产生的对微生物有保护作用的生物高聚物, 因其安全无毒、理化性质独特等优良性质而倍受关注<sup>[1,2]</sup>, 他除具有大多数植物多糖和合成的高分子聚合物所特有的性质外, 还具有低浓度下呈高粘度、假塑性、热稳定性, 可与

多种盐类配伍及形成有用的膜, 同时具有生产周期短、不受气候和地理环境条件的限制、易于提取和应用面广等特性, 所以在工业生产与生活的许多领域具有广阔的发展前景, 如作为微生物絮凝剂、保鲜剂、抗癌医药品、包装材料等<sup>[2~4]</sup>。据 Eveleigh 统计<sup>[5]</sup>, 有 49 属 76 种微生物产生胞外多

\* 国家“863”计划 (No. 2004AA227110-3)

国家自然科学基金重大项目 (No. 90202019)

\*\* 通讯作者 Tel: 0991-7885368, E-mail: panhuixia@163.com

收稿日期: 2006-03-29, 修回日期: 2006-06-22

糖,但真正有应用价值并已进行或接近工业化生产的仅有十几种,人们只对其中少数作了研究并证明微生物胞外多糖有极大的工业应用价值<sup>[6]</sup>。现在世界上每年多糖总需求量在 100 万吨左右,总价值约 150 亿美元,因而多糖的生产具有巨大的市场<sup>[7]</sup>。

众所周知,荒漠化是当今国际社会极为关注的全球性的环境问题,而我国是受荒漠化危害最为严重的国家之一。已有的研究表明,一些低营养细菌,如芽孢杆菌具有粘性荚膜或厚的果胶质外壁,能分泌大量的粘液,这些具有粘性附属物的菌体和粘液能将矿物细粒粘结,形成球状表面团聚<sup>[8]</sup>。本论文经过吐鲁番及古尔班通古特沙漠小区试验也证明,该菌液体培养物可在流沙表面结成一层微生物结皮,并对多年生干旱荒漠植物如中麻黄、乌拉尔甘草等有保水、保苗作用。因此,将该株寡营养细菌所产生的胞外粘性多糖应用于防沙治沙工程,必将产生巨大的社会、生态效益。

本文首次从新疆的低营养环境中分离得到一株产大量粘性胞外多糖的寡营养细菌,对胞外多糖的发酵条件作了初步研究,为进一步开发应用特殊环境微生物奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种:**由本实验室从寡营养环境中分离纯化得到一株产胞外多糖的寡营养细菌,经初步鉴定为固氮菌属的成员 (*Azotobacter Beijerinck*)。

**1.1.2 培养基:**(1)斜面种子培养基其组成为:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2g,  $\text{MgSO}_4$  0.2g,  $\text{NaCl}$  0.2g,  $\text{CaSO}_4$  0.2g,  $\text{CaCO}_3$  5g, 葡萄糖 (每升培养基中含碳量为 15mg), 琼脂粉 11g, 蒸馏水定容至 1,000mL, pH7.0 ~ 7.2。按照配比加入上述物质后,将培养基趁热分装在试管中,每个试管装 5mL 左右。(2)发酵基础培养基:基本成分同斜面培养基 (不加琼脂),其中所要优化成分被代替。

### 1.2 培养方法

**1.2.1 种子平板培养:**以无菌操作从原始菌种斜面中挑取一环转入 5mL 的无菌水试管中制成菌液,充分振荡使菌液混匀,用无菌吸管分别吸取 0.1mL 菌液于平板中以无菌刮铲涂布,置于培养

箱中,37℃ 培养 3 ~ 5d,使菌种长满平板。

**1.2.2 一级种子摇瓶培养:**将长满菌种的平板用无菌刮铲刮入装液量为 80mL 的 250mL 的一级种子瓶中,37℃、180r/min 回转式摇床上振荡培养 72h。

**1.2.3 摇瓶发酵培养:**将一级种子以 15% 接种量转到装液量为 100 mL 的 250mL 的摇瓶中,37℃、180r/min 在回转式摇床上振荡培养 72h,测定有关参数和指标。

### 1.3 发酵分析方法

**1.3.1 菌体生物量的测定:**见文献[9]。

**1.3.2 粗多糖含量测定:**发酵液去除单糖后,用苯酚硫酸法测定<sup>[10,11]</sup>。

**1.3.3 pH 值的测定:**pHS-3C 型酸度计测定。

**1.3.4 粘度的测定:**使用 NDJ-79 型旋转式粘度计,27℃ 测定;501 型超级恒温器。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因子优化培养基的试验

深层培养的培养基不仅直接影响着寡营养细菌 *Azotobacter* sp. 的生长,而且对 *Azotobacter* sp. EPS 的产量及以后的上罐发酵也有着很大的影响。因此,优化培养基配方是非常重要的。

**2.1.1 不同碳源对 *Azotobacter* sp. EPS 产量和粘度的影响:**按 1.1.2 (2) 中培养基的基本成分,改变发酵培养基中的碳源,在摇瓶发酵培养基中分别以葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、甘露醇、可溶性淀粉作为碳源 (碳源含量均为 15mg/L 培养基),初始 pH 值 7.0 左右,接种后在 37℃、180r/min 下振荡培养 72h,测定粘度和多糖产量,设置 3 个重复,结果如图 1 所示。

由图 1 可知,不同碳源产糖效果为:蔗糖 > 葡萄糖 > 可溶性淀粉 > 麦芽糖 > 甘露醇,粘度效果为:蔗糖 > 葡萄糖 > 可溶性淀粉 > 麦芽糖 > 甘露醇,这与碳源产糖效果一致。蔗糖作为碳源时多糖产量及粘度均为最高,葡萄糖次之,其它几种碳源多糖产量及粘度均较低,故选蔗糖为最佳碳源。

**2.1.2 不同碳酸钙量对 *Azotobacter* sp. EPS 产量和粘度的影响:**发酵液的 pH 值随时间延长逐渐下降,一般到 pH 值为 6.8 左右多糖合成中止,对发酵不利。为达到缓冲 pH 的目的,许多文献报道采

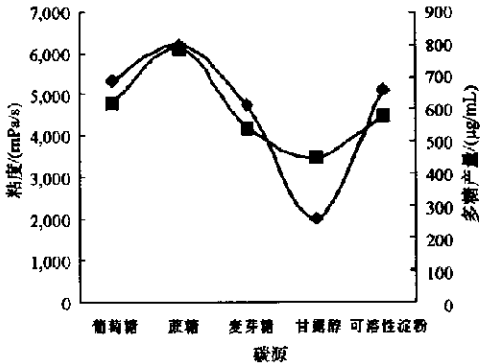


图 1 不同碳源对 *Azotobacter* sp. EPS 产量和粘度的影响

—□— 粘度, —●— 多糖产量

用添加  $\text{CaCO}_3$  的方式,不但有利于提高多糖的粘度<sup>[12]</sup>,对多糖产量增加也十分有效。钙离子对多糖合成的促进作用在细菌和藻类多糖研究中早已被发现<sup>[13]</sup>,有人认为是由于钙离子促进了多糖合成中表异构酶 (epimerase) 的作用,宏观上表现为发酵液粘度增大。

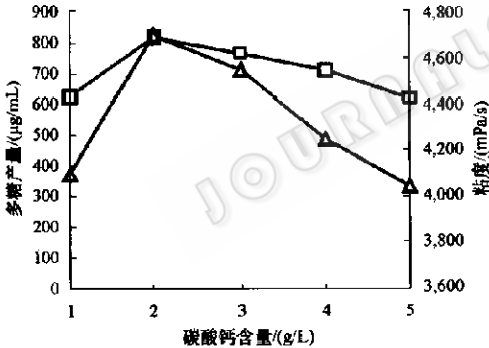


图 2 不同碳酸钙含量对 *Azotobacter* sp. EPS 产量和粘度的影响

—□— 多糖产量, —△— 粘度

图 2 的结果表明,钙离子对 *Azotobacter* sp. 的菌体生长和多糖合成都有明显作用,原因可能是碳有钙离子调节和培养基 pH 调节的双重作用。随着液体培养基中碳酸钙含量的增加,多糖产量与发酵液粘度均呈现先增加后下降的趋势。当碳酸钙含量为 2g/L 时,多糖产量达到最大为 816.19μg/mL,随后多糖产量有所下降。可见,过多添加碳酸钙会产生沉淀,不利于发酵。钙离子对菌体生长和多糖合成的促进作用的机理可能并不简单,还有待于探讨。

2.1.3 不同无机盐含量对 *Azotobacter* sp. EPS 产量和粘度的影响: ① 不同  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  含量对 *Azotobacter* sp. EPS 和粘度的影响: 在发酵培养基内分别加入不同量的磷酸二氢钾接种后进行发酵。从图 3 可以看出,随着培养基中的磷酸二氢钾含量增加,多糖产量先增加后降低,但变化幅度不大,当其含量为 0.3g/L 时多糖产量达到最大为 997.80μg/mL,故应控制磷酸二氢钾的量为 0.3g/L 为宜。

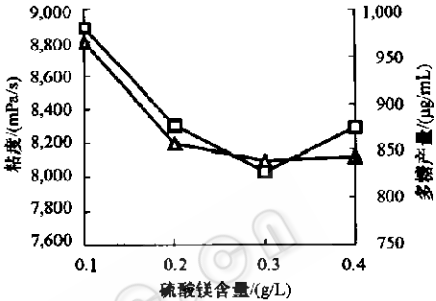


图 3 不同  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  含量对 EPS 产量和粘度的影响

—△— 粘度, —□— 多糖产量

② 不同  $\text{MgSO}_4$  含量对 *Azotobacter* sp. EPS 和粘度的影响: 在发酵培养基内分别加入不同量硫酸镁接种后进行发酵。从图 4 可以看出,随着培养基中硫酸镁的含量增加,多糖产量先呈下降趋势,同时发现,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  也存在一个限量添加问题,当其含量为 0.4g/L 时多糖产量又略有增加,但低于硫酸镁含量为 0.1g/L 时的多糖产量 978.72μg/mL,故应控制硫酸镁的量为 0.1g/L 为宜。

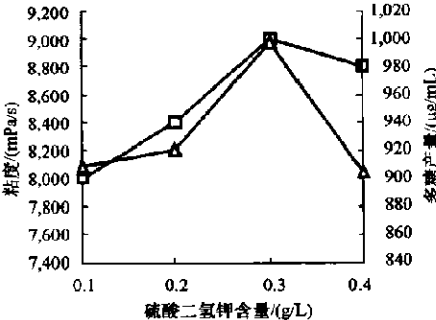


图 4 不同  $\text{MgSO}_4$  含量对 EPS 和粘度的影响

—□— 粘度, —△— 多糖产量

2.2 摇瓶培养工艺条件的优化试验

2.2.1 温度对 *Azotobacter* sp. EPS 产量和粘度的影

响:一般来说,多糖生产的适宜温度也是微生物生长的适宜温度。在摇瓶发酵培养基中,接入种子,分别在25℃、29℃、33℃、37℃、41℃ 5种不同的温度下,180r/min下振荡培养72h,测定粘度和多糖产量,设置3个重复,结果见图5。由图可知,温度太高或太低时胞外多糖产量均不高,发酵的最适宜温度为37℃,此温度下 *Azotobacter* sp. EPS产量最高。

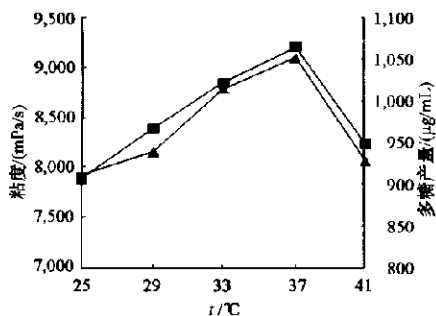


图5 不同温度对 *Azotobacter* sp. EPS产量和粘度的影响

—■— 粘度, —▲— 多糖产量

**2.2.2 不同初始pH值对 *Azotobacter* sp. EPS产量和粘度的影响:**将发酵培养基的初始pH值分别调为6、7、8、9、10,其中发酵培养基pH为7.0。接种后,在37℃、180r/min下振荡培养72h,测定粘度和多糖产量,设置3个重复,结果见图6。

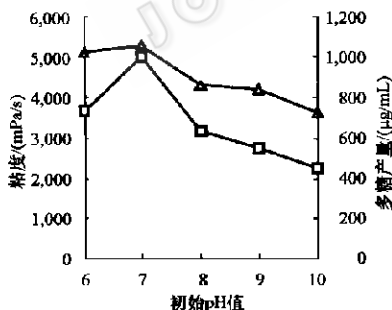


图6 不同初始pH值对 *Azotobacter* sp. EPS产量和粘度的影响

—□— 粘度, —△— 多糖产量

由图6可知,培养基的初始pH值会对多糖的合成产生明显的影响。初始pH值为7时多糖产量达到最高为1003.79μg/mL,当pH低于6或高于10时,多糖产量较低。在pH7.0两侧,随着pH的减小,多糖产量的下降程度要大于pH增加时多

糖产量的下降,且pH越高越不利于多糖合成。因此当初始pH值在一定范围内维持较高水平对多糖的合成有利,选择7.0为最佳初始pH。

**2.2.3 溶氧量对 *Azotobacter* sp. EPS产量和粘度的影响:**本试验在250mL摇瓶中,分别装入50mL、75mL、100mL、125mL发酵培养基,在37℃下,180r/min转速进行试验,设置3个重复。

培养基的装液量为50mL和75mL时,发酵液粘度和多糖量都较高,也即装液量减少,产糖量增加,说明 *Azotobacter* sp. 菌在发酵过程中适当增加通气量有利于发酵,尤其是培养后期,因为随着 *Azotobacter* sp. 胞外多糖的积累,粘度增加,氧气量不足,所以必须有充足的通气量。*Azotobacter* sp. 胞外多糖产量随培养基装液量的减少而增加,正是由于较少的装液量提供了充足的通气量,也说明此发酵为好氧发酵。所以选择50mL(250mL摇瓶)为最佳装液量。

**2.2.4 产胞外多糖摇瓶发酵曲线测定及菌体生长和多糖的形成:**将接种好的100mL/250mL液体培养基置于37℃摇床发酵培养,分别培养12、24、36、48、60、72、84、96h后取出,设置3个重复,其发酵曲线如图8所示。由图7可知,在0~12h为 *Azotobacter* sp. 菌的迟滞期,12h生物量仅为0.08g/mL,12~48h生物量增加迅速从12h的0.08g/mL增加至48h的0.14g/mL为 *Azotobacter* sp. 菌的旺盛生长期,48~72h生物量从0.14g/mL增加至0.17g/mL,生物量略有增加较为稳定为 *Azotobacter* sp. 菌的稳定期,72~96h生物量有所降低为 *Azotobacter* sp. 菌的衰亡期。由图7中的多糖产量曲线可知,多糖产量曲线与生物量曲线趋势基本一致。在培养12~72h内,随着培养时间的

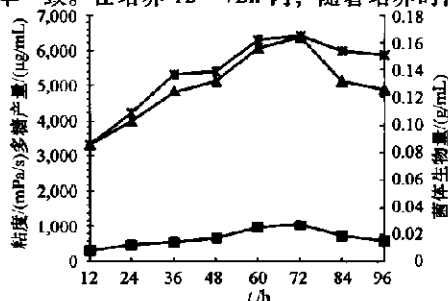


图7 寡营养细菌 *Azotobacter* sp. 液体摇瓶发酵曲线

—■— 多糖产量, —▲— 粘度, —●— 菌体干重

延长,发酵液粘度增大,多糖产量逐渐增加,其中在培养时间为72h即培养3d时发酵液粘度、多糖产量均达到最高,此后由于基质的消耗和环境因素的影响,胞外多糖产量又有所降低。可以看出,胞外多糖的积累主要集中在72h左右,随着发酵的进行发酵后期营养物质变得不充足,菌体分泌出的多糖可能又被自身利用,所以胞外粗多糖的产量在72h以后下降,若以胞外粗多糖产量为指标,应选择发酵时间为72h。

### 3 讨论与结论

近年来,生物土壤结皮的生态学研究逐渐成为荒漠化地区生态研究的热点问题<sup>[14,15]</sup>,利用该株寡营养细菌所产生的胞外粘性多糖可在流沙表面结成一微生物结皮。他能够高效地利用有限的降雨,使结皮中的微生物恢复生物活性,并且有效地积累有机碳并固定大气中的氮素进而传递给高等植物,从而对荒漠地区养分循环起到促进作用<sup>[16]</sup>。同时,生物结皮的形成对稳定沙物质,抵御风蚀沙暴,提高荒漠防护体系的整体稳定性都起到了不可估量的作用。

本文通过对该株寡营养细菌产胞外粘多糖的摇瓶发酵条件进行了研究,旨在能将其用于沙漠化防治,使固定沙丘不再活化,生态环境不断优化。现通过发酵条件的研究得出以下结论:

(1) 本文首次对低营养环境下寡营养细菌产生的胞外多糖发酵条件进行了研究,为进一步开发应用特殊环境下寡营养微生物奠定了良好。

(2) 初步确定了该菌株发酵的最适培养基和培养条件如下:培养基成分:蔗糖 15mg,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1g,  $\text{NaCl}$  0.2g,  $\text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.2g,  $\text{CaCO}_3$  2g, 蒸馏水定容至 1,000mL, pH 7.0。于 37℃ 摇瓶培养 72h, 250mL 摇瓶装液量为 50mL。上述发酵培养基的优化组合研究对于提高多糖产量有明显效果,在此条件下,菌种产糖量最大可达到 1,145.94 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 粘性可达 9,200  $\text{mPa} \cdot \text{s}$ 。

(3) 寡营养细菌胞外多糖产量与发酵液粘度

的变化趋势始终一致,可见发酵液粘度值与胞外多糖产量呈正相关。

(4) 在发酵培养基中添加适量碳酸钙,能对 pH 值起缓冲作用,避免酸性过强以阻碍产物的生成。如加钙量不足会使多糖不能与钙离子完全反应而形成粘性凝胶不易分离,加钙量过高会由于终产品中含有较高的残钙而直接影响产品的质量。当碳酸钙的量为 2g/L 时,多糖产量和粘度都是积累最高的时候,此时为最适量。

(5) 发酵培养基以蔗糖代替葡萄糖作为碳源,能使胞外多糖的产量得到较大幅度的提高。

(6) 培养基中不需添加任何氮源菌种则能良好生长,该菌可能是具有固氮活性的寡营养细菌。

### 参考文献

- [1] 宋绍富,崔吉,罗一青,等. 油田化学, 2004, 21 (1): 91~96.
- [2] 魏培莲. 浙江科技学院学报, 2002, 14 (2): 8~12.
- [3] Roberto De P, Claudio S, Raffaella P. Journal of Applied Physiology, 2001, 13: 293~299.
- [4] 胡承钰,王三英. 厦门大学学报(自然科学版), 2001, 40 (5): 32~35.
- [5] Eveleigh D E. Handbook of Microbiology, 1978, 2: 39.
- [6] 洪家林. 微生物学通报, 1988, 15 (1): 35~37.
- [7] 陈光,张良妮. 吉林农业大学学报, 2001, 1: 42~46.
- [8] Greene R S B, Chaires C J. Aust J Soil Res, 1990, 28: 753~777.
- [9] 戴明华,邹文欣,郁文焕. 南京大学学报, 1995, 31 (3): 436~441.
- [10] 董群,郑丽伊,方积年. 中国药学杂志, 1996, 31 (9): 551.
- [11] 张龙翔,张庭芳,李令媛. 生化实验方法和技术. 北京:人民教育出版社, 1982. 9~11.
- [12] 刘秀芳,王修垣. 微生物学报, 1993, 33 (1): 40~47.
- [13] Page W J, Sadoff H L. J Bacteriol, 1975, 122: 154.
- [14] Li X R, Wang X P, Zhang J C. Biol Fertil Soils, 2002, 35: 147~154.
- [15] Xu J, Bai X L, Yang C, et al. Acta Phytocologica Sinica, 2003, 27 (4): 545~551.
- [16] Aranibar J N, Anderson I C, Ringerose S, et al. Journal of Arid Environment, 2003, 54: 345~358.