

由原油及其制品生产细菌胞外多糖的研究

III. 产粘短杆菌 74-230 合成胞外多糖的适宜培养基

王修垣 刘秀芳 史志敬 吴诚华

(中国科学院微生物研究所, 北京)

本文报道一种适于产粘短杆菌 74-230 合成胞外多糖的培养基。其组成为 (g/l): NaNO_3 1.5—2.0, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.0, KH_2PO_4 0.6, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25, 酵母膏 1.5—2.0, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.06, 重液体石蜡 4%(V/V), pH 7.5。硝酸盐和磷酸盐低于或高于上述浓度不利于多糖的合成。提供适量的酵母膏为该菌高产多糖所必需。在最适条件下, 发酵液经水稀释到 3 倍, 用毛细管粘度计测定, 粘度达到 500—700 cSt 或更高 (45°C)。离心除去菌体后, 用乙醇沉淀, 得到多糖 12g/l 或更多, 对重液体石蜡的收率为 40% 以上。

微生物胞外多糖的发酵工业在国际上正在发展^[1-4], 而我国尚待建立。我们在前文^[5]中报道了一株利用原油或重液体石蜡合成胞外粘多糖的菌株的分类鉴定结果, 定为一新种: 产粘短杆菌 (*Brevibacterium yiscogenes* n. sp. 74-230)。将该菌的多糖发酵液稀释至 5 cSt (45°C) 作为驱动液进行了室内模拟试验。当注入量相当于 20% 孔隙体积时, 二次采油量的提高值约为原始储油量的 9%^[4]。这种多糖也可能用于钻井泥浆等方面, 从而使它具有工业生产的前景。

本文报道适于菌株 74-230 合成胞外多糖的培养基组份。

材料和方法

(一) 菌株: 产粘短杆菌 74-230, 分离自南京炼油厂油污土样。

(二) 培养基和培养条件: 分离得到产粘短杆菌 74-230 的培养基^[5]成份为 (g/l): NaNO_3 10.0, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 4.0, KH_2PO_4 0.6, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03, CaCl_2 0.06, 酵母膏 0.1, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.5×10^{-5} ,

$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 3.0×10^{-5} , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 6.0×10^{-5} , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5×10^{-4} , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.0×10^{-5} , 原油 10% (W/V), 自来水 1l, pH 7.0—7.5, 250ml 三角瓶装 50 ml 培养液, 8 磅 30 分钟灭菌。此培养基是我们采用正交试验优选法确定最适培养基成份的基础。

用营养琼脂斜面上 28°C 生长 3—5 天的培养物作为种子, 按需要, 离心洗涤或不离心洗涤, 作成悬浮液, 等量接种。培养物置 200 转/分旋转式摇床上培养 4 天。

(三) 测定方法: 发酵液粘度的测定, 在用水稀释 1 或 2 倍后用奥氏毛细管粘度计于 45°C 下进行。总糖量在发酵液用蒸馏水稀释至 150 倍后用蒽酮法测定。

结 果

(一) 种龄: 将营养琼脂斜面上生长不同时间的细胞悬浮液等量接种。发酵液粘度的测定结果 (表 1) 表明, 用 96—120 小时的培养物作为种子较为适宜。在原油和烃类培养液中预培养后再接种, 无明显效果。

本文于 1981 年 5 月 7 日收到。

表 1 不同种龄对多糖合成的影响

Table 1 Effect of ages of the inoculum on polysaccharide syntheses

| 碳源 Carbon sources | 原油 Crude oil 10% (W/V) | | | 重液体石蜡 Paraffin oil 4% (V/V) | | |
|---------------------------------------|----------------------------|-------|-------|--------------------------------|-------|-------|
| | 种龄(小时) Inocula ages (h) | 48 | 96 | 216 | 48 | 120 |
| 粘度 Viscosities (cSt, 1:1* diluted) | 42.57 | 74.11 | 58.72 | 47.59 | 74.93 | 38.04 |

* 发酵液与水的稀释比,下同

(二) 通气量: 试验用 250ml 三角瓶, 分别装入 25、50、75 和 100 ml 培养液进行培养。从发酵液粘度和总糖量的测定结果 (图 1) 可以看出, 以 250ml 三角瓶装 50—75 ml 培养液为适宜。这表明, 该菌的需氧程度不高。

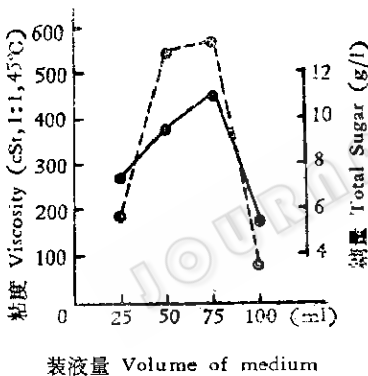


图 1 通气程度对菌株 74-230 合成多糖的影响
Fig. 1 Optimal medium volume in 250ml Erlenmeyer flasks

○—○ 粘度 Viscosity
●—● 总糖量 Total sugar

(三) 碳源: 用单一正-链烷作为菌株 74-230 合成胞外多糖的碳源的试验证明^[4], C₁₁—C₂₂ 的正-链烷均可作为发酵的底物, 而以 C₁₆—C₁₈ 的链烷为最好。据此, 我们选用了锦西炼油厂生产的重液体石蜡为碳源。其正-链烷的组份为 (%): C₁₂ 1.7, C₁₃ 8.6, C₁₄ 18.7, C₁₅ 21.7, C₁₆ 21.4, C₁₇ 17.7, C₁₈ 8.1

和 C₁₉ 2.8, 均可作为合成多糖的底物。当培养液中加量为 4% (V/V) 时, 发酵结束, 培养液中几乎没有残余油。

(四) 培养基组成: 培养基的成份及其浓度对于不同微生物形成不同的产物的重要性是不同的。在上述分离用的培养基中氮和磷都很丰富, 可能适于菌体的生长, 不利于多糖的合成, 需要加以改变。为此, 采用多因素试验正交优选法^[6] L₁₆ (4⁴ × 3²) 正交表, 改变 N、P、Mg、酵母膏、Fe 和微量元素的浓度, 结果见表 2。

根据试验结果, 采用直观分析, 作出因素和指标 (培养液粘度和总糖量) 的关系图。如图 2。从图 2 看出, 通过正交试验得到培养基各成份的最适用量为 (g/l): KH₂PO₄ 0.6, NaNO₃ 1.5—2.0, NaH₂PO₄ 2.0, FeSO₄ 和微量元素可以省去, MgSO₄ 尚可减少, 酵母膏尚未求出上限。

单因子试验的结果表明, 酵母膏用量以 1.5—2.0 g/l 为适宜 (图 3), MgSO₄ 用量可降至 0.25g/l (图 4)。

(五) 起始 pH: 短杆菌属的一些菌株的最适 pH 为 7—9, *Brevibacterium viscogenes* n. sp. 74-230 合成多糖的最适 pH 范围为 7.5—8.5 (图 5)。

(六) 氮源: 为了寻找更适宜的廉价的氮源, 以 NaNO₃ 1.5g/l 的含氮量为准, 分别加入不同的含氮化合物。结果表明

表 2 $L^{16}(4^4 \times 3^2)$ 正交试验结果Table 2 Results of orthogonal design of experiment ($L^{16}(4^4 \times 3^2)$)

| | A Na ₂ HPO ₄ (g/l) | B 酵母膏 Yeast extract (g/l) | C NaNO ₃ (g/l) | D KH ₂ PO ₄ (g/l) | E MgSO ₄ (g/l) | F FeSO ₄ (g/l) | G 微量元素 Trace elements | 结果 Results | | | |
|---|--|---------------------------------------|---------------------------------|---|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--|-------|----------------------------|-------|
| | | | | | | | | 粘度 Viscosity (cSt, 1:2, 45°C) | | 总糖 Total sugar (g/l) | |
| 1 | 1(4.0) | 2(1.0) | 3(2.0) | 2(0.6) | 2(0.5) | 1(0.03) | 2(+) | 373.4 | 323.4 | 9.60 | 10.32 |
| 2 | 3(2.0) | 4(2.0) | 1(1.5) | 2(0.6) | 1(1.0) | 2(0) | 2(+) | 527.8 | 434.2 | 9.50 | 9.70 |
| 3 | 2(3.0) | 4(2.0) | 3(2.0) | 3(1.0) | 2(0.5) | 2(0) | 1(0) | 458.9 | 467.5 | 9.70 | 9.75 |
| 4 | 4(1.0) | 2(1.0) | 1(1.5) | 3(1.0) | 1(1.0) | 1(0.03) | 1(0) | 85.3 | 78.5 | 9.15 | 8.90 |
| 5 | 1(4.0) | 3(1.5) | 1(1.5) | 4(1.5) | 2(0.5) | 2(0) | 1(0) | 434.2 | 444.2 | 9.40 | 9.75 |
| 6 | 3(2.0) | 1(0.5) | 3(2.0) | 4(1.5) | 1(1.0) | 1(0.03) | 1(0) | 152.4 | 122.3 | 8.80 | 7.85 |
| 7 | 2(3.0) | 1(0.5) | 1(1.5) | 1(0) | 2(0.5) | 1(0.03) | 2(+) | 1.6 | 1.4 | 0.65 | 1.55 |
| 8 | 4(1.0) | 3(1.5) | 3(2.0) | 1(0) | 1(1.0) | 2(0) | 2(+) | 4.8 | 5.1 | 2.00 | 2.55 |
| 9 | 1(4.0) | 1(0.5) | 4(1.0) | 3(1.0) | 1(1.0) | 2(0) | 2(+) | 109.0 | 82.7 | 6.65 | 6.20 |
| 10 | 3(2.0) | 3(1.5) | 2(3.0) | 3(1.0) | 2(0.5) | 1(0.03) | 2(+) | 237.2 | 228.6 | 9.50 | 9.15 |
| 11 | 2(3.0) | 3(1.5) | 4(1.0) | 2(0.6) | 1(1.0) | 1(0.03) | 1(0) | 66.3 | 117.2 | 8.95 | 8.70 |
| 12 | 4(1.0) | 1(0.5) | 2(3.0) | 2(0.6) | 2(0.5) | 2(0) | 1(0) | 6.9 | 4.9 | 3.30 | 3.40 |
| 13 | 1(4.0) | 4(2.0) | 2(3.0) | 1(0) | 1(1.0) | 1(0.03) | 1(0) | 4.1 | 3.4 | 2.65 | 2.55 |
| 14 | 3(2.0) | 2(1.0) | 4(1.0) | 1(0) | 2(0.5) | 2(0) | 1(0) | 2.9 | 2.7 | 1.65 | 1.30 |
| 15 | 2(3.0) | 2(1.0) | 2(3.0) | 4(1.5) | 1(1.0) | 2(0) | 2(+) | 36.1 | 31.7 | 7.10 | 6.10 |
| 16 | 4(1.0) | 4(2.0) | 4(1.0) | 4(1.5) | 2(0.5) | 1(0.03) | 2(+) | 57.2 | 80.8 | 10.10 | 9.25 |
| 粘度 Calculated from viscosity | K ₁ | 221.8 | 60.2 | 250.9 | 3.3 | 116.3 | 120.8 | 153.2 | | | |
| | K ₂ | 147.6 | 116.8 | 69.1 | 231.8 | 195.4 | 190.9 | 158.4 | | | |
| | K ₃ | 213.5 | 192.2 | 238.5 | 218.5 | | | | | | |
| | K ₄ | 40.4 | 254.2 | 64.9 | 169.9 | | | | | | |
| 总糖 Calculated from total sugar | K ₁ | 7.14 | 4.80 | 7.30 | 1.86 | 6.71 | 7.35 | 6.61 | | | |
| | K ₂ | 6.56 | 6.77 | 5.47 | 7.93 | 6.77 | 6.13 | 6.87 | | | |
| | K ₃ | 7.18 | 7.50 | 7.57 | 8.63 | | | | | | |
| | K ₄ | 6.08 | 7.90 | 6.60 | 8.54 | | | | | | |

(表 3) 以 NaNO₃ 最好, NH₄NO₃ 和尿素次之, NH₄Cl 和 (NH₄)₂SO₄ 可能由于 pH

下降太多而不利, 需要在培养过程中保持 pH 的稳定性。

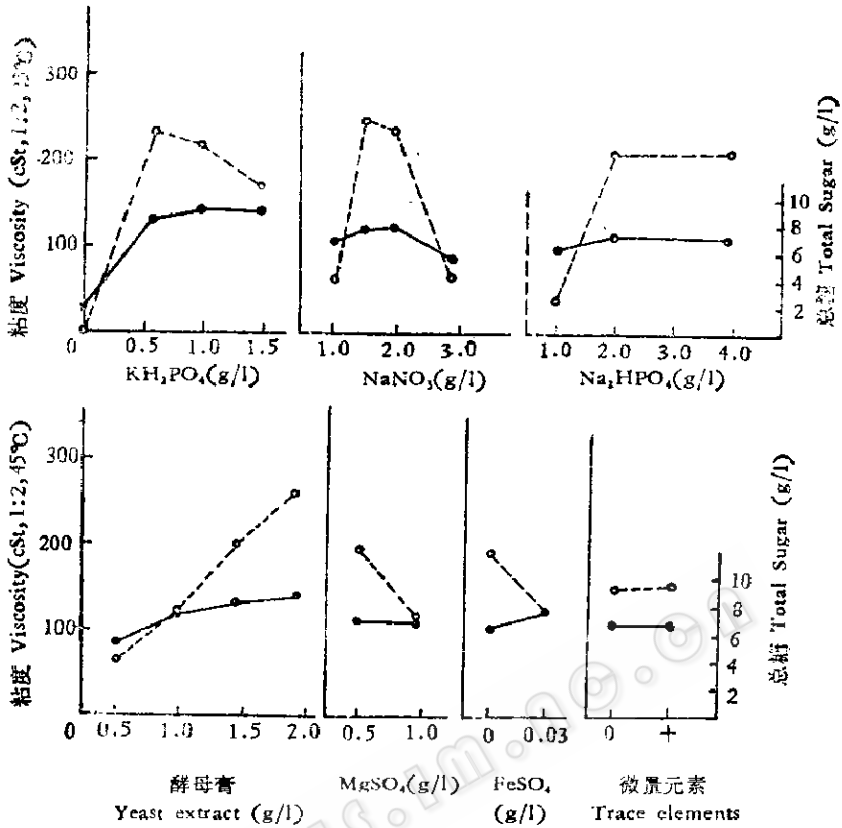


图 2 用多因素试验正交优选法确定培养基组份的最适量

Fig. 2 Optimization of the medium compositions by orthogonal design of experiment

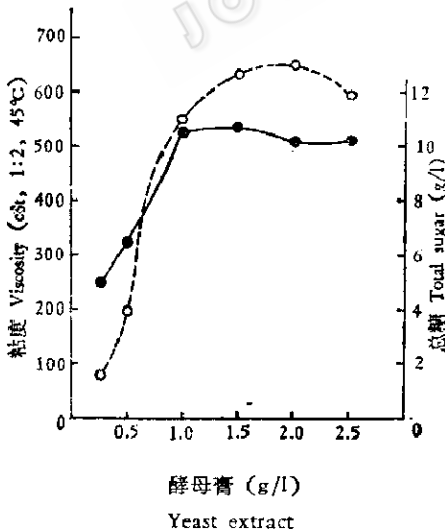


图 3 酵母膏的最适浓度

Fig. 3 Optimal concentration of yeast extract

○—○ 粘度 Viscosity ●—● 总糖 Total sugar

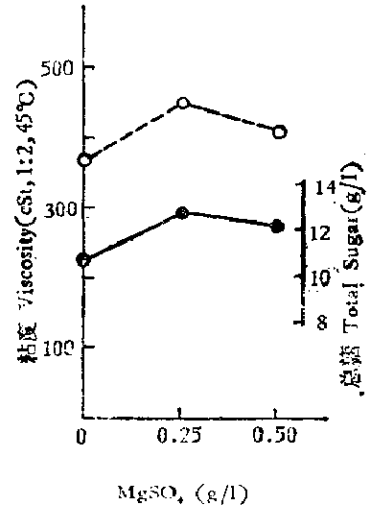


图 4 MgSO₄ 的最适浓度

Fig. 4 The optimal concentration of MgSO₄

○—○ 粘度 Viscosity ●—● 总糖 Total sugar (g/l)

表 3 不同氮源的比较

Table 3 Comparison of different nitrogen sources

| 氮源 Compounds | | NaNO ₃ | NH ₄ NO ₃ | (NH ₂) ₂ CO | NH ₄ Cl | (NH ₄) ₂ SO ₄ |
|---------------------------------------|------------|-------------------|---------------------------------|------------------------------------|--------------------|---|
| 多糖 Polysaccharide (g/l) | | 9.66 | 6.38 | 4.7 | 1.22 | 1.67 |
| 粘度 Viscosity (cSt, 1:2 diluted, 45°C) | | 642.38 | 49.19 | 24.2 | 0.82 | 0.79 |
| pH | 起始 Initial | 7.58 | 7.58 | 7.58 | 7.58 | 7.58 |
| | 最终 Final | 5.2 | 4.2 | 4.2 | 3.5 | 3.3 |

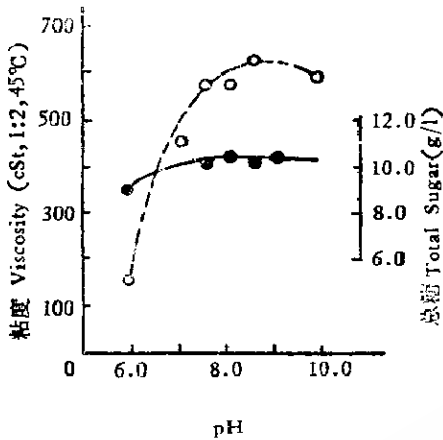


图 5 起始 pH 的影响

Fig. 5 Effect of initial pH

○---○ 粘度 Viscosity ●---● 总糖 Total sugar

讨 论

微生物胞外多糖的生产虽然已有相当规模的发展,而关于培养基成份对于多糖生物合成影响的研究并不充分,而以烃类为底物者研究更少。

Slodki 在微生物多糖生产的综述^[2]中指出,对于多糖生物合成重要的是碳源和氮源的类型和含量。对于有些菌株,控制磷酸盐、硫酸镁^[7-10]、碳酸钙、生物素、Mn²⁺和 Fe²⁺等^[11,12]的含量也相当重要。

鉴于菌株的正常生长和产物的积累取决于培养基各组份之间的综合平衡,我们采用了多因素试验正交优选法调整培养基

各成份的含量使之达到平衡。得到适于 *Brevibacterium viscogenes* n. sp. 74—230 合成多糖的培养基成份。与分离培养基比较,氮和磷的含量大大降低。这与许多作者的结果相一致^[2,12]。他们的试验证明, N 和 P 的浓度超过一定的水平,会刺激细菌的生长,但不利于多糖的合成。

从图 2 和 3 均可看出,培养液的粘度随酵母膏的用量而提高。这表明,酵母膏为该菌合成多糖所需的因子。

对比图 2、3 和 5 的粘度和总糖量的变化曲线可以看出,总糖量与培养液粘度有一定的相关性。同时也看到,总糖量大致相等而粘度有明显的差别。这是因为多糖溶液的粘度不仅取决于多糖的浓度,而且也取决于多糖的分子量(聚合度)。总糖量相等而粘度高,表明多糖的聚合度高。

在分离到此菌时,用分离培养基培养,在 45°C 下测得以原油为碳源的发酵液(未稀释)粘度为 19.4 cSt^[3]。通过培养基成份的最优化研究,不仅简化了培养基的成份,降低了成本,而且使重液体石蜡为碳源的发酵液粘度大大提高,在 1:2 稀释的条件下,达到 500—700 cSt (45°C) 或更高。在离心除去菌体后,用乙醇沉淀得到多糖 12g/l 或更多,对重液体石蜡的收率为 40% 或更多。

参 考 文 献

- [1] Sutherland, I. W. and D. C. Ellwood: In "Microbial Technology: Current State, Future Prospects", ed by Bull, A. T. et al., Cambridge University Press, Cambridge, 107—150, 1979.
- [2] Slodki, M. E. and M. C. Cadmus: In "Advances in Applied Microbiology" vol. 23: 19—54, 1978.
- [3] 王修垣等: 微生物学报, 20(4): 345—350, 1980.
- [4] 王修垣, 王传柱: 石油学报, 1(4): 77—85, 1980.
- [5] Takahashi, J., et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 34(1): 32—37, 1970.
- [6] 俭济斌: 多因素试验正交优选法, 科学出版社, 北京, 1976.
- [7] Cadmus, M. C. et al.: *Appl. Microbiol.* 10 (2): 153—156, 1962.
- [8] Cadmus, M. C., H. Gasdorf, et al.: *Appl. Microbiol.*, 11: 488, 1963.
- [9] Lawson, C. J.: *Chem. Ind. (London)*, No. 6: 258—261, 1976.
- [10] Slodki, M. E., et al.: *Appl. Microbiol.*, 19 (6): 1019—1020, 1970.
- [11] Anderson, R. F. et al.: *Arch. Biochim. Biophys.*, 89: 289—292, 1960.
- [12] Harada, T., and Yoshimura, T.: *Biochim. Biophys. Acta*, 83(3): 374—376, 1964.
- [13] Гоголева, Е. В. и др.: *Микроб.*, XLV(5): 800—805, 1976.

STUDIES ON MICROBIAL EXOPOLYSACCHARIDES PRODUCED FROM CRUDE OIL AND OILPRODUCTS

III. A SUITABLE MEDIUM FOR EXOPOLYSACCHARIDE SYNTHESIS BY *BREVIBACTERIUM VISCOGENES* N. SP. 74-230

Wang Xiuyuan Liu Xiufang Shi Zhijing Wu Chenghua

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

A suitable medium has been established for expolysaccharide synthesis by *Brevibacterium viscogenes* n. sp. 74-230. Its composition is as following (g/l): NaNO_3 1.5—2.0, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.0, KH_2PO_4 0.6, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25, yeast extract 1.5—2.0, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.06, heavy liquid paraffin 4% (V/V), pH 7.5. The concentration of nitrate and phosphate over or below the above level is unfavourable for polysaccharide synthesis. Addi-

tion of adequate amount of yeast extract is indispensable for the high yield biosynthesis. Viscosities of the fermented gummy liquid are as high as 500—700 cSt on Ostwald viscosimeter at 45°C after a 3-fold dilution with tap water. After spun down the cells over 12 g/l of polysaccharide is obtained by ethanol precipitation and the yield based on heavy liquid paraffin is over 40%.