微生物学报 31 (1): 75—81, 1991
Acta Microbiologica Sinica

两株黄单胞菌多糖生产菌的鉴定

刘秀芳 王修垣 崔文华 何文华
(中国科学院微生物研究所,北京)

黄单胞菌多糖 (Xanthan gum) 是由野油菜黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris*) 以糖质原料为底物产生的。这种多糖溶液具有高粘度、假塑性,对广范围的盐浓度、pH、温度、二价离子和剪切降解作用等比较稳定,可配伍性较好,且可被生物降解而无污染环境的特点,因而常作为增稠剂、悬浮剂和稳定剂等广泛地应用于食品、农业、消防、造纸、摄影、制药、化工、印染和陶瓷等方面。该产品的最大用量是在石油工业中[1-4]。

我国六十年代开始研究微生物胞外多糖在石油工业中的应用[5]。已发表的关于黄单胞菌多糖的研究报告均以淀粉为底物[6,7]。考虑到以淀粉为底物在用酒精提取产物时会发生产物与残余淀粉的共沉淀,影响产品的质量,我们筛选到了以蔗糖为底物产生黄单胞菌多糖的菌株 L4,并成功地进行了 20 吨发酵罐的投产试验。在鉴定菌株 L4 时,用中国农业科学院植物保护研究所鉴定过的菌株 L5 (原编号 农-005, Accc-10048)[8] 为对照菌。本文报道这两株菌的鉴定结果。

材料和方法

(一) 菌株来源

菌株 L4 分离自黑色病斑的萝卜中。菌株 L5 由中国农业科学院植物保护研究所何礼远同志惠赠。

(二) 分离、筛选培养基和培养条件

菌株分离用马铃薯汁琼脂培养基。筛选用培养基的成分为 (g/L): $NaNO_3$ 0.5; 蔗糖 40.0; 酵母膏 2.0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25; KH_2PO_4 0.5; 自来水 1 L, pH 7.0—7.5。250 ml 三角瓶内装 50 ml 培养基。0.53 kg/cm² 灭菌 30 min。

取纯化菌株的斜面培养物 1 管,接入上述三角瓶中,置 200 r/min 旋转摇床 28—30℃,培养 3—4 d。

发酵液粘度用 RV-II 旋转粘度计 45℃ 下测定。多糖量是将发酵液的乙醇沉淀物在 60—70℃ 干燥后称至恒重。以发酵液粘度和多糖量作为菌株筛选的指标。

(三) 鉴定方法

菌株 L4 和 L5 的鉴定方法按文献 [9, 12] 的方法进行。

结果和讨论

菌株 L4 是从几十株分离的菌中筛选出来的,并以蔗糖为底物发酵生产多糖为好,而菌株 L5 则以淀粉为佳。这两株菌所产多糖的理化分析结果见文献[14,15]。

(一) 细胞形态

菌株 L4 和 L5 在马铃薯汁琼脂斜面上培养 20—24 h,细胞均为杆状,两端钝圆,多为单个、二联,少多联(图 1)。L4 为 0.4—0.5×0.7—1.3 μm; L5 为 0.4—0.5×0.8—1.5 μm,这与原鉴定者的报道[8]不一致。其他形态特征列在表 2 中。

(二) 培养特征

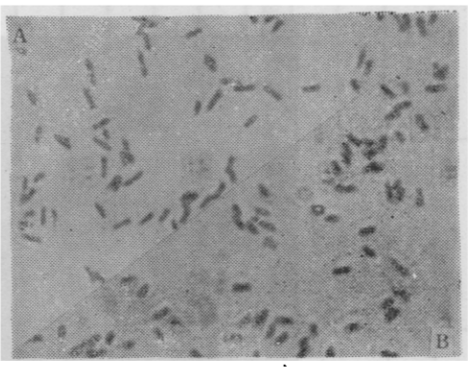

图 1 细胞形态 (×1600)
A. 菌株 L5 B. 菌株 L4

本文于 1990 年 3 月 14 日收到。
本所技术室摄制电镜照片;赵苓同志参加了 G+C 含量和生长温度的测定,谨致谢忱。本课题为国家"七五"重点科技项目。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

表1 菌株 L4 和 L5 分别用不同底物产生多糖的比较*

碳源 \ 菌株	菌株 L4		菌株 L5	
	粘度(厘泊)	多糖产量 (g/L)	粘度(厘泊)	多糖产量 (g/L)
葡萄糖	1579	12.90	23063	11.40
蔗糖	6547	21.23	27060	15.04
淀粉	5919	18.90	28290	18.40

* 这两株菌的粘度是用不同的粘度计测定的，故两株菌之间不具互比性。

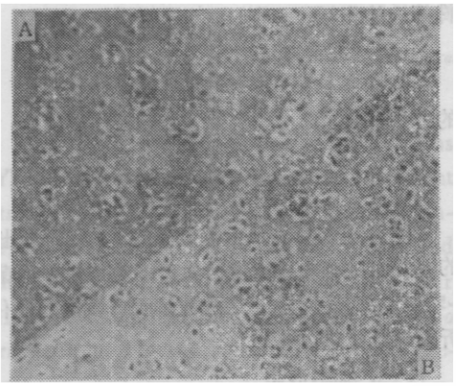

图2 荚膜(马铃薯汁琼脂斜面上，×1,200)
A. 菌株 L5(72h) B. 菌株 L4(45h)

1. 营养琼脂平板和马铃薯汁琼脂平板：两菌的菌落均为圆形，稍隆起，表面光滑湿润；边缘整齐、半透明。培养1周，在营养琼脂上菌落直径为6—7 mm，在马铃薯汁琼脂上约9—10 mm，菌落为淡黄色—黄色，但 L5 色泽较深，粘性较大。

2. 营养琼脂斜面、马铃薯汁琼脂斜面和天门冬素琼脂斜面：两株菌均呈中度—丰厚生长，菌苔线形，边齐。其他特征同上。

3. 马铃薯块：3—4 天布满斜面，马铃薯块不变色。其他特征同上。

4. 肉汤培养基：培养液呈混浊状，表面有淡黄色膜，底有淡黄色沉淀；具粘性，L5 的粘性较大，且色较深。

(三) DNA 中 G + C mol% 含量的测定

按文献[13]的方法进行测定。菌株 L4 DNA 中G + C含量为 64.0 mol%，菌株 L5 为 65.0±1.0 mol %。这两株菌的G + C百分含量均处在伯杰细菌鉴定手册[11] *Xanthomonas campestris* 的数值 63.5—69.2 mol% (Tm, Bd) 范围内。

(四) 生理生化特性

菌株 L4 和 L5 的最适生长温度和合成多糖的温度：用 TN-3F 型温度梯度培养箱中测得。从图4看到，这两株菌的最适生长温度和产多糖温度基本相当，在 29—30℃ 之间。它们在 4℃

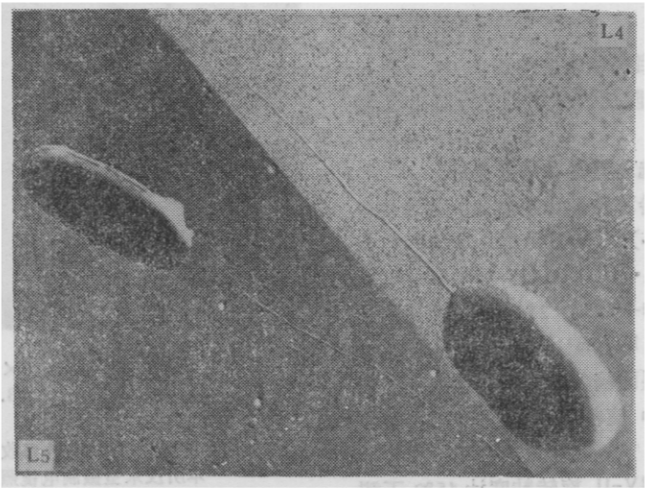

图3 菌株 L5 和 L4 的电镜照片 (×17000)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

表 2　菌株 L4 和 L5 与其它野油菜黄单胞菌鉴别特征的比较

项目 \ 株菌	"手册"[10,11]	L4	L5	农-005[8]	农-008[8]	南开-01[5]	山大-152[7]
细胞大小（μm）	0.3—0.5×0.7—2.0	0.4—0.5×0.7—1.3	0.4—0.5×0.8—1.5	0.7—0.9×2.0—3.0	0.7—0.9×1.6—2.5	0.5×1.3	0.4—0.5×1.0—1.2
革兰氏染色	−	−	−	−	−	−	−
荚膜	+	+	+	+	+	+	+
芽孢	−	−	−	−	−	−	−
鞭毛	极生鞭毛	极生单鞭毛	极生单鞭毛	极生单鞭毛	极生单鞭毛	极生	极生鞭毛
营养琼脂平板菌落	圆形蜡黄，光滑，光泽，边齐，半透明，粘稠	圆形，稍凸起，光滑，光泽，黄色，边齐，半透明，粘稠	圆形，稍凸起，光滑，光泽，黄色，边齐，半透明，粘稠	圆形，稍凸起，光泽，灰黄或金黄，边齐，粘稠	圆形，稍凸起，光泽，灰黄或金黄，边齐，粘稠	圆形，光滑，边齐，黄色，粘稠	圆形，淡黄色，粘稠
牛肉汁	混浊，黄环，薄膜	混浊，薄膜，粘稠	混浊，薄膜，粘稠	混浊，无菌环	混浊，无菌环	粘稠	
温度	28—30℃，最高39℃	4℃和40℃不生长，25—30℃生长良好	4℃和40℃不生长，25—30℃生长良好	25—28℃生长好，超过38℃不生长	25—28℃生长好，超过38℃不生长	7℃生长，28℃生长好 4℃不生长	最适30℃，40℃不生长
耐 NaCl 最高浓度(%)	2.0—5.0	4.0	3.0	3.0—4.0	3.0—4.0	2.0—4.0	4.0
吲哚	弱或−	−	−	弱阳性	弱阳性	−	
硝酸盐还原	−	−	−	−	−	−	−
H_2S 产生	+	+	+	+	+	+	+
果胶水解	+(亦有不水解的)	−	−			−	
明胶水解	+	+	+	+	+	+	+
石蕊牛奶	变碱，消化酪蛋白形成酪氨酸结晶	胨化，微变碱	胨化，微变碱	消化，显碱性	消化，显碱性	胨化，不产酸	胨化，不变色
淀粉水解	+	+	+	+	+	+	+
脂肪水解	+	+	+	+	+		
水解七叶灵	+	+	+	+	+	+	+
脲酶活性	−	−	−	−	−	−	−
从糖类产酸							

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

表 2（续）

项目 \ 菌株	“手册”[10,11]	L5	L4	农-005[8]	农-008[4]	南开-01[6]	山大-152[7]
葡萄糖	+	+	+	+	+	+	+
乳糖	+	+	−	+	+		
甘油	+	+	+				
甘露糖醇	±	−	−	−	−		
阿拉伯糖	+	+	+	+	+	+	+
甘露糖	+	+	+	+	+	+	
半乳糖	+	+	+	+	+	+	+
海藻糖	+	+	+			+	+
纤维二糖	+	+	+			+	+
果糖	+	+	+	+	+	+	
蔗糖	+	+	+	+	+	+	
麦芽糖	d	+	−	+	−	+	
木糖	d	+	+	−	−		
核糖	d	+	+				
蜜二糖	d	+	+			+	
棉子糖	d	+	+				
松三糖	d	+	−				
糊精	d	+	+				
糖原	d	±	±				
核糖醇	−	+	+				

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

山梨糖醇	−	−	−	−	−		
卫矛醇	−	−	−	−	−		
鼠李糖	−	−	−				
水杨苷	−	−	−	−	−		
肌醇	−	−	−				
菊粉	−	−	−				
α-甲基-D 葡萄糖苷	−	−	−				
有机酸的利用							
乙酸盐	+	+	+			+	
柠檬酸盐	+	+	+			+	
苹果酸盐	+	+	+			+	
丙二酸盐	+	+	+				
琥珀酸盐	+	+	+			+	
乳酸盐	+	+	+				
草酸盐		+	+			−	
dl-酒石酸盐	−	−	−			−	
苯甲酸盐	−	−	−				
接触酶	+	+	+	+	+	+	
V. P. 反应	−	−	−			−	
天冬酰胺上生长	−	−	−				
精氨酸脱氢酶	−	−	−				
赖氨酸脱羧酶	−	−	−				
鸟氨酸脱羧酶	−	−	−				
氧化酶		−	−	−	−	−	

注：+：正反应；−：负反应；d：有 11—89% 的菌株为正反应；空白：缺资料。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

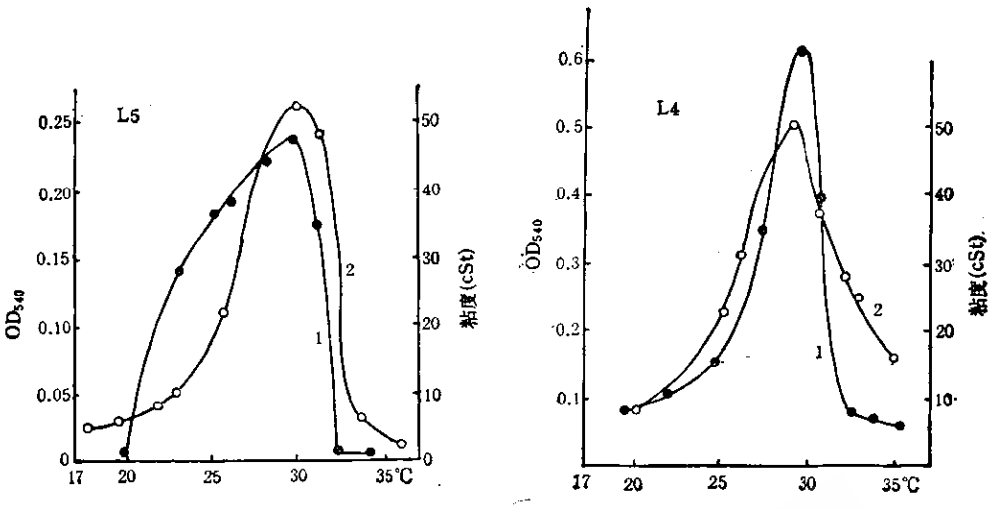

图 4 温度对 L5 和 L4 生长和产多糖的影响

和 40℃ 均不生长，10℃ 和 37℃ 微弱生长；在脱脂牛奶中加热至 72℃ 15 min 失活。

初始生长 pH 为 5.0—9.0 pH 为 6.5—8.5 生长良好。

对氧的要求：需氧。

菌株 L4 和 L5 的其他生理生化特性列于表 2，并与国内已发表的菌株[6-8]和伯杰细菌鉴定手册[11]（下简称"手册"）的资料相比较。

从表 2 可看出，菌株 L4 在细胞大小、吲哚形成和从木糖产酸上与菌株农-005 和农-008 不同；从麦芽糖产酸上与农-008 不同；从核糖醇产酸上与"手册"[11]不符；在利用草酸盐上与菌株南开-01 不同。

菌株 L5 从乳糖、核糖醇产酸上与"手册"[11]不符；在大小、吲哚形成、从乳糖、木糖产酸方面与菌株农-005 和农-008 不同，从麦芽糖产酸上与农-005 不同，在利用草酸盐和从麦芽糖产酸上与菌株南开-01 有别。

菌株 L4 和 L5 的差别是：菌株 L4 能从乳糖、麦芽糖、松三糖产酸，而菌株 L5 则不能。

以上虽有几处不同，但根据菌株 L4 和 L5 的形态和培养特征以及生理生化特性和 DNA 中 G + C mol% 含量与"手册"[10,11]和国内已发表的四株 *Xanthomonas campestris* 的资料相比较，其重要的鉴别特征则几乎完全一致，所以把它们列为同一种的不同菌株：*Xanthomonas campestris* L4 和 *X. campestris* L5。

参 考 文 献

[1] Slodki, M. E. et al.: *Adv. in Appl. Microbiology*, **23**: 19—54, 1978.
[2] Sandford, P. A.: *Adv. in Carbonhydr. Chem. Biochem.*, **36**: 265—313, 1979.
[3] Kennedy, J. E. and I. J. Bradshaw: *Progress in Industrial Microbiol.*, **19**: 319—372, 1984.
[4] Paul, F. et al.: *Biotech. Adv.*, **4**: 245—259, 1986.
[5] 王修垣：工业微生物学成就，张树政、王修垣主编，科学出版社，北京，第145—162页，1988。
[6] 赵大健等：工业微生物，**16**(3)：11—20，1986。
[7] 江伯英等：山东大学学报(自然科学版)，**23**(3)：113—119，1988。
[8] 何礼远等：植物保护学报，**10** (3)：179—184，1982。
[9] 中国科学院微生物研究所细菌分类组：一般细菌常用鉴定方法，科学出版社，北京，1978。
[10] Breed, R. S. et al.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th ed., London, pp. 153—159, 1957.
[11] Krieg, N. R. and J. G. Holt: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1, Williams and Wilkins Comp., Baltimore/London, pp. 199—209, 1984.
[12] Dye, D. W.: *New Zealand J. of Science*, **5** (4): 393—416, 1962.
[13] 周慧玲：微生物学报，**18**(2)：134—139，1978。
[14] 崔文华等：分析微生物学专辑，程光胜等主编，科学出版社，北京，第 128—131 页，1988。
[15] 崔文华等：微生物学报，**30** (6)：422—425，1990。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

IDENTIFICATION OF TWO XANTHAN-PRODUCING STRAINS

Liu Xiufang　Wang Xiuyuan
Cui Wenhua　He Wenhua
(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Two xanthan-producing strains were selected: the strain L4 uses sucrose as a better C-source for xanthan production, while the strain L5 tends to utilize starch. Their cell morphological and cultural characters, physiological and biochemical properties, as well as G+C mol% contents of DNA are almost all consistent with the differentiating characteristics of *Xanthomonas campestris* described in "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" and other papers published in China. Therefore, both the strain L4 and L5 are identified as *X. campostris* L4 and *X. campestris* L5, respectively.

Key words

Xanthomonas campestris; Xanthan-producing bacteria

JOURNALS.IM.AC.CN

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn