

野油菜黄单胞菌 L₄ 生产黄单胞菌多糖的适宜条件*

刘秀芳 王修垣

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

研究了野油菜黄单胞菌 L₄ 生产黄单胞菌多糖的适宜培养基和培养条件。培养基组成 (g/L) 为: 蔗糖 40—50, 铵盐 1.0—1.25, 酵母膏 2.0—3.0, CaCO₃ 3.0, MgSO₄·7H₂O 0.25, Na₂HPO₄·12H₂O 0.1, 柠檬酸 0.01—0.10, pH7.5。种龄为 48 小时以上。在 30℃ 于旋转式摇床 (200r/min) 上培养 3 天, 发酵液粘度高达 14000—16000cp。用乙醇沉淀得多糖 28g/L 以上。

关键词 野油菜黄单胞菌; 黄单胞菌多糖

黄单胞菌多糖 (Xanthan) 是由野油菜黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris*) 生产的一种极有应用价值的微生物多糖(国内亦有人称为黄原胶)。这种多糖具有特殊的粘度和悬浮能力, 所以引起人们的广泛注意。美国首先对这类多糖进行了研究^[1,2]。作为 *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 一种发酵产品, 首先由 Rogovin 等作了报道^[3]。现在美国和欧洲已工业生产, 并广泛应用于食品、油田以及多种工业领域^[4,5]。

我国对这类多糖也已开展了研究工作^[6,7]。我们所筛选到的黄单胞菌多糖生产菌株 L₄, 经鉴定, 定为野油菜黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris*) L₄^[8]。该菌所产多糖经理化分析与美国生产的 Xanthan 相同^[9]。本文将报道该菌株生产多糖的一些适宜条件。

材料和 方法

(一) 菌种

野油菜黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris*) L₄ 分离自萝卜的黑色病斑中。

(二) 培养基和培养条件

1. 菌种用培养基: 马铃薯汁琼脂斜面。

2. 基础培养基成分(g/L)为: 蔗糖 40.0, 硝酸钠 0.5, 酵母膏 2.0, MgSO₄·7H₂O 0.25, KH₂PO₄ 0.5, 自来水 1.0L, pH7.0—7.5。250ml 三角瓶内装 50ml 培养基, 0.53kg/cm² 灭菌 30 分钟, 备用。

3. 培养条件: 将在马铃薯汁琼脂斜面上培养 1—2 天的菌苔用无菌水洗下, 制成菌悬液。吸取 2ml 菌液接入上述培养基中, 于 30℃, 转速为 200r/min 旋转式摇床上培养 3—4 天。以改变培养基的成分及培养条件进行产多糖试验。

(三) 测定方法

发酵液的粘度用旋转粘度计 RV-II 型或 Brookfield LV 型, 在 45℃ 或室温下测定。

本文于 1991 年 4 月 1 日收到。

* “七五”国家重点科技攻关项目。

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。

结果和讨论

(一) 碳源对菌株 L₁ 生产黄单胞菌多糖的影响

碳源不仅是生产多糖的基质,也是菌体增殖的能源。多糖产量受碳源种类和加入量的影响。国外多以葡萄糖为碳源^[3,10],国内则多以淀粉为碳源^[6,7]。本实验对葡萄糖、蔗糖和玉米淀粉加以比较。表 1 结果表明,该菌利用蔗糖更有利于多糖合成。蔗糖浓度为 4% 时,发酵液粘度和多糖产量都最高(图 1)。

表 1 不同碳源的比较

Table 1 Comparison of different carbon sources

碳源 Carbon sources	粘度 (cp)* Viscosity	多糖 (g/L) Xanthan
葡萄糖 Glucose	15129	7.8
蔗糖 Sucrose	24910	13.38
玉米淀粉 Maize starch	17804	11.84

* 表 1—4 及图 1—7 中的粘度为 RV-II 型粘度计,45℃ 下测定;而表 6—8 中的粘度为 Brookfield LV 型粘度计,4 号转子,30r/min,室温下测定的。

* Viscosities in table 1—4 and fig. 1—7 were measured by rotary viscometer Model RV-II at 45℃, while viscosities in table 6—8 were measured by Brookfield Viscometer Model LV, 30rpm, No. 4 spindle, at room temperature.

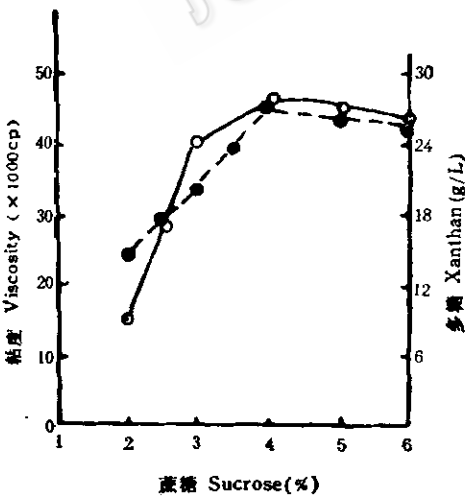


图 1 蔗糖的最适浓度

Fig. 1 Optimal concentration of sucrose.

○—○ 粘度 Viscosity; ●—● 多糖 Xanthan

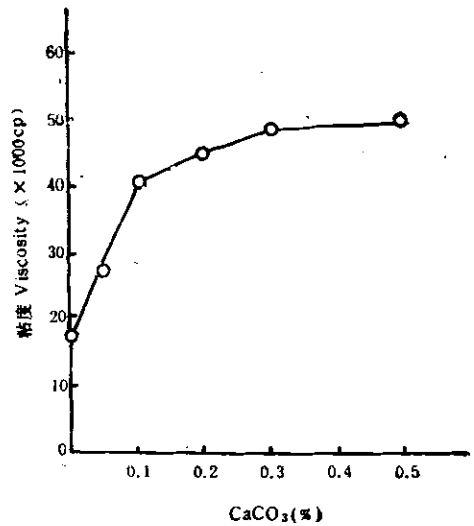


图 2 CaCO₃ 对黄单胞菌多糖合成的影响

Fig. 2 Effect of CaCO₃ on xanthan synthesis

(二) 碳酸钙的影响

基础培养基中加入 CaCO_3 明显地提高了发酵液的粘度, 并随 CaCO_3 浓度的增加而提高, 这说明 Ca^{2+} 的存在促进了多糖的合成^[11,12]。从图 2 看出, CaCO_3 的浓度为 3% 时较为适宜。

(三) 氮源对黄单胞菌多糖合成的影响

多糖的合成受氮源类型和加入量的影响。实验选择了七种氮源进行比较。从表 2 可以看出, 利用铵盐作氮源, 发酵液的粘度最高, 其次是硫酸铵。铵盐的加入量以 0.1—0.125% 为宜(图 3)。

表 2 不同氮源对黄单胞菌多糖合成的影响

Table 2 Effect of different nitrogen sources on xanthan syntheses

氮源 Nitrogen sources	粘度 (cP) Viscosity
蛋白胨 Peptone	34617
胰蛋白胨 Tryptone	35083
尿素 Urea	26555
铵盐 Ammonium salt	50615
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	38054
NaNO_3	16805
KNO_3	20793

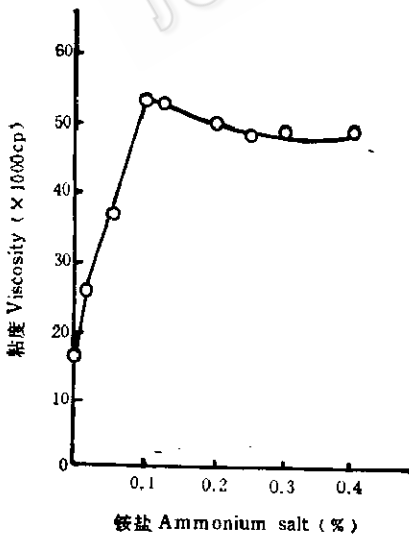


图 3 不同浓度的铵盐对黄单胞菌多糖合成的影响

Fig. 3 Effect of various concentration of ammonium salt on xanthan syntheses

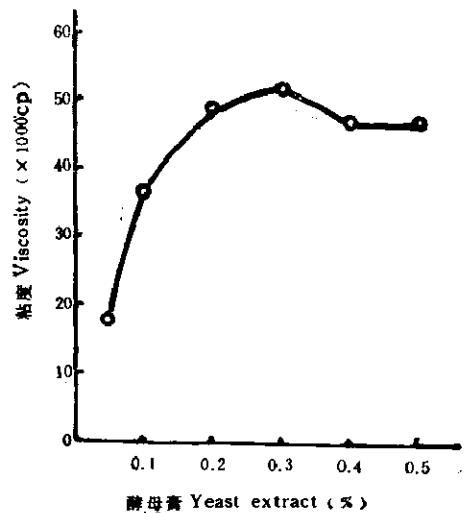


图 4 酵母膏对黄单胞菌多糖合成的影响

Fig. 4 Effect of yeast extract on xanthan syntheses

(四) 酵母膏的影响

酵母膏对黄单胞菌多糖的合成影响很大。当培养基中不加酵母膏时,发酵液很稀,但随着酵母膏的加入和浓度的增加,发酵液的粘度也随之增高。当酵母膏的浓度为 0.2—0.3% 时,发酵液的粘度较高(图 4)。

(五) 硫酸镁的影响

Mg²⁺ 对多糖合成是有利的^[33]。多批实验结果已得到证实。其适宜加量为 0.025% (图 5)。

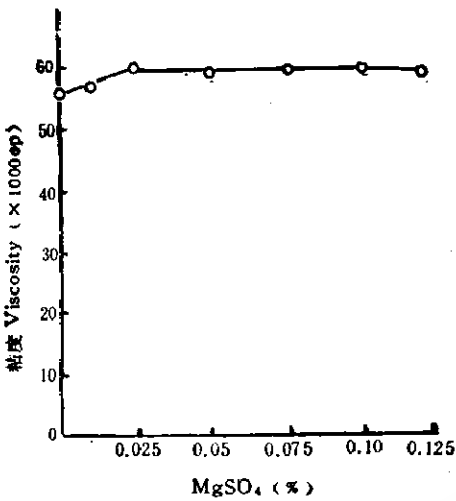


图 5 MgSO₄ 对黄单胞菌多糖合成的影响

Fig. 5 Effect of MgSO₄ on xanthan syntheses

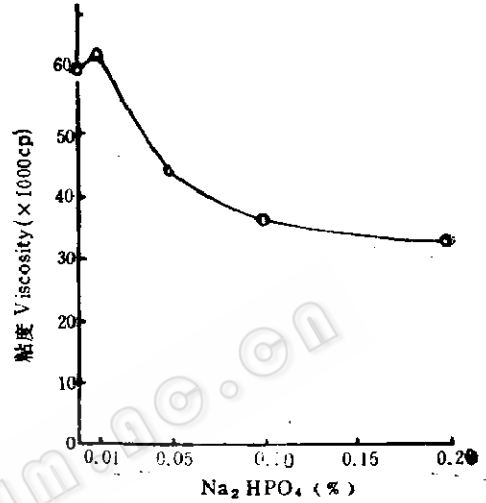


图 6 Na₂HPO₄ 对黄单胞菌多糖合成的影响

Fig. 6 Effect of Na₂HPO₄ on xanthan syntheses

(六) 磷酸氢二钠的影响

图 6 表明,加入 0.01% 的磷酸氢二钠对菌株 L₄ 合成黄单胞菌多糖是有利的。

(七) 磷酸二氢钾的影响

在培养基中加入不同量的 KH₂PO₄, 但对菌株 L₄ 合成黄单胞菌多糖没有明显促进作用。

(八) 柠檬酸的影响

在培养基中加入少量的有机酸对多糖合成有促进作用^[14]。我们选择了柠檬酸进行实验。从表 3 可以看出,加入 0.001—0.01% 的柠檬酸对菌株 L₄ 合成黄单胞菌多糖确有促

表 3 柠檬酸对黄单胞菌多糖合成的影响

Table 3 Effect of citrate on xanthan syntheses

柠檬酸 (g/L) Citrate	粘度 (cp) Viscosity
0.00	61265
0.01	64530
0.05	63912
0.10	64686
0.50	59668
1.00	54705

进作用。

(九) 通气量的影响

在 250ml 三角瓶中分别装入 25、50、75、100ml 的培养基进行培养。图 7 的结果表明,在 250ml 三角瓶内装量为 25 和 50ml 时,发酵液的粘度和多糖量都较高。这表明,在多糖发酵中需要较高的通气量。

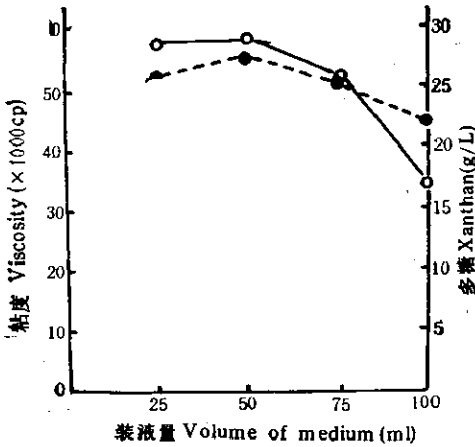


图 7 通气量对黄单胞菌多糖合成的影响

Fig. 7 Optimal medium volume in 250ml Erlenmeyer flasks

○—○ 粘度 Viscosity; ●---● 多糖 xanthan

(十) 接种量与发酵时间的影响

将培养两天的 L₁ 菌苔用无菌水洗下,制成菌悬液,用无菌吸管吸取不同量的菌液接入培养基中,并进行不同时间的培养。从表 4 中看出,发酵两天时,接种量为 2ml 以上的发酵液的粘度较高。当发酵时间长时,接种量的多少对多糖合成影响不大。接种量为 2—3ml, 发酵三天,发酵液粘度最高。

(十一) 培养基中碳、氮比的影响

培养基中碳、氮量的比例直接影响多糖的产量。如果碳的含量低,氮的含量过高,只能促进细胞大量增殖,而不利于多糖合成。

表 4 接种量与发酵时间对黄单胞菌多糖合成的影响

Table 4 Effect of inoculum volume and fermentation time on xanthan syntheses

粘度 (cp) Viscosity	接种量 (ml) Inoculum volume	发酵时间 (d) Fermentation time		
		两天 2d	三天 3d	四天 4d
	1.0	50353	62983	63138
	2.0	56015	65305	63912
	3.0	54874	66697	63757
	4.0	55089	64840	62055
	5.0	55627	62737	60881

表 5 培养基中不同碳氮比对黄单胞菌多糖合成的影响

Table 5 Effect of different proportion of carbon and nitrogen in medium on xanthan syntheses

铵盐 (g/L) Ammonium salt	蔗糖 (g/L) Sucrose	多糖 (g/L) Xanthan			
		20	30	40	50
1.00		14.78	22.60	28.18	28.02
1.25		15.24	20.98	27.68	28.64
1.50		14.50	20.70	26.30	27.26
2.00		15.66	21.08	26.70	27.98

只有在碳的浓度较高,氮的浓度较低时,才有利于多糖合成^[15,16]。为了既能产生大量多糖,又能节省原料,进行了不同碳、氮量的组合试验(表 5)。结果表明,蔗糖为 50.0g/L,铵盐为 1.25g/L 时,多糖量最高;其次是蔗糖为 40.0g/L,铵盐为 1.0g/L 时。但从转化率看,后者(70.45%)比前者(57.28%)高,故蔗糖的加入量为 40.0—50.0g/L,铵盐为 1.0—1.25g/L 较宜。

(十二) 起始 pH 的影响

培养基中 CaCO₃ 的存在为灭菌后将 pH 调至酸性造成困难。菌株 L₁ 在 pH7.0—9.0 均能较好的合成多糖,而以 pH7.5 为最好(表 6)。

表 6 起始 pH 对黄单胞菌多糖合成的影响

Table 6 Effect of initial pH on xanthan syntheses

pH	粘度 (cP) Viscosity	多糖 (g/L) Xanthan
7.0	14850	26.48
7.5	15500	28.13
8.0	15000	25.92
8.5	14900	25.68
9.0	13200	25.40
10.0	6422	18.59

(十三) 种龄及发酵时间的影响

将马铃薯汁琼脂斜面上生长不同时间的 L₁ 菌苔分别制成菌悬液,等量接种,分别培养不同时间。从表 7 中看出,种龄长的,培养两天时的发酵液粘度和多糖量就已达到了较高的水平。也就是说,延长种龄可以缩短发酵时间,这和 Wernau 报道^[17]的用生长稳定的种菌接种比用对数生长期的可以明显缩短发酵周期相一致。种菌在 48 小时以上为好,发酵时间在 2—3 天即可。

表 7 种龄及发酵时间对多糖合成的影响

Table 7 Effect of inocula ages and fermentation time on Xanthan Synthesis

种龄 (小时) Inocula Ages(h)	24		48		96		144		192	
	粘度 Viscosity (cp)	多糖 Xanthan (g/L)	粘度 Viscosity (cp)	多糖 Xanthan (g/L)	粘度 Viscosity (cp)	多糖 Xanthan (g/L)	粘度 Viscosity (cp)	多糖 Xanthan (g/L)	粘度 Viscosity (cp)	多糖 Xanthan (g/L)
24	105	7.64	232	9.00	488	9.80	840	11.50	230	9.42
48	4750	17.52	9100	22.47	11050	24.28	11800	24.73	12250	25.54
72	14050	27.13	14350	27.06	14200	27.09	14200	27.25	14690	27.41
96	14100	26.91	14150	27.31	14600	27.53	14350	27.03	15400	27.41
120	14440	27.19	14180	26.74	14120	26.49	14850	27.62	16250	28.00

注: 24 小时的发酵液的粘度是用 Brookfield LV 型粘度计 2 号转子 30r/min 测定的。

Note: Viscosities of fermented fluid for 24 hours were measured by Brookfield viscometer Model LV 2* 30r/min.

根据以上结果可以确定, 野油菜黄单胞菌菌株 L₄ 生产黄单胞菌多糖的适宜培养基和培养条件如下: 培养基成分 (g/L): 蔗糖 40—50, 铵盐 1.0—1.25, 酵母膏 2.0—3.0, CaCO₃ 3.0, MgSO₄·7H₂O 0.25, Na₂HPO₄·12H₂O 0.1, 柠檬酸 0.01—0.1; pH 7.5。种龄 48 小时以上。30℃, 200r/min 摇床上培养三天, 发酵液粘度高达 14000—16000cP, 多糖量达 28g/L 以上。将此培养基与基础培养基加以比较(表 8)。适宜培养基中 1, 2 两种组合对菌株 L₄ 生产黄单胞菌多糖都是适宜的。蔗糖浓度为 50g/L 时, 多糖产量为 31.93g/L, 转化率为 63.86%; 蔗糖为 40g/L 时, 多糖产量为 28.23g/L, 则转化率为 70.6%。这大大高于基础培养基的 33.45% 的转化率。也高于或相当于美国的黄单胞菌多糖生产菌株 *X. campestris* NRRL B-1459 (约 60%)^[18] 和国内产黄单胞菌多糖的菌株 N. K-01(55%)^[6] 及 S-152(57.3—72.5%)^[7] 的转化率。

表 8 基础培养基和适宜培养基的比较

Table 8 Comparison of basic medium and suitable medium

	基础培养基 Basic medium	适宜培养基 Suitable medium*	
		1	2
粘度 (cp) Viscosity	3000	14387	16400
多糖 (g/L) Xanthan	13.38	28.23	31.93

* 1. 蔗糖 40, 铵盐 1.0, 酵母膏 2.0(g/L);

2. 蔗糖 50, 铵盐 1.25, 酵母膏 3.0(g/L)。

* 1. Sucrose 40, Ammonium salt 1.0, Yeast extract 2.0(g/L);

2. Sucrose 50, Ammonium salt 1.25, Yeast extract 3.0(g/L)。

参 考 文 献

- [1] Leach, J. G. et al.: *Phytopathology*, 47(3): 113—120, 1957.
- [2] Lilly, V. G. et al.: *Appl. Microbiol.*, 6(2): 105—108, 1958.
- [3] Rogovin, S. P. et al. *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.*, 3(1): 51—63, 1961.
- [4] Andrew, T. R.: *Extracellular Microbial Polysaccharides* (ed. Sandford, P. A. and Laskin, A.), ACS Symposium Series, 45: 231—241, 1976.
- [5] Holzwarth, G.: *Developments in Industrial Microbiology*, 26: 271—280, 1984.
- [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] 刘秀芳等: *微生物学报*, 31(1): 75—81, 1991。
- [9] 崔文华等: *微生物学报*, 30(6): 422—425, 1990。
- [10] Cadmus, M. C. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 20: 1003—1014, 1978.
- [11] Corpe, W. A.: *J. Bacteriol.*, 88(5): 1433—1441, 1964.
- [12] Haradam T. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 29(8): 757—762, 1965.
- [13] Sutherland, I. W.: *Adv. Microbial Physiol.*, 8: 143—213, 1972.
- [14] 浜田信威: *科学 & 工业*, 55(4): 21—23, 1981。
- [15] Duguid, J. P. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 9: 174—189, 1953.
- [16] Wilkinson, J. F. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 11: 59, 1954.
- [17] Wernau, W. C.: *Developments in Industrial Microbiology*, 26: 263—269, 1984.
- [18] Sandford, P. A. et al.: *Extracellular Microbial Polysaccharides* (ed. Sandford, P. A. and Laskin, A.) ACS Symposium Series, 45: 192—210, 1976.

SUITABLE CONDITIONS FOR XANTHAN PRODUCTION BY *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* L.

Liu Xiufang Wang Xiuyuan

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Suitable conditions has been established for xanthan produced by *Xanthomonas campestris* L. Composition of the medium is as following(g/L): sucrose 40—50, ammonium salt 1.0—1.25, yeast extract 2.0—3.0, CaCO₃ 3.0, MgSO₄·7H₂O 0.25, Na₂HPO₄·12H₂O 0.1, citrate 0.01—0.10; pH 7.5. Inocula ages are over 48 hours. Under these conditions the viscosities of gummy cultures incubated on rotary shaker at 30°C for 3 days are as high as 14000—16000 cp. And over 28g/L xanthans are obtained by alcohol precipitation.

Key words *Xanthomonas campestris*; Xanthan