

维氏固氮菌 *Y1047* 诱变株产海藻酸条件的研究^{*}

陈声明 贾小明 周龙云^{**} 叶旭红^{**} 董淡如

(浙江农业大学环境保护系 杭州 310029)

摘 要 维氏固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*) *Y1047* 诱变株在培养温度为 30℃, 摇床转速 200r/min 情况下, 产海藻酸的最佳培养基为(g/L): 蔗糖 25, 酵母膏 1.0, NaAc 1.5, CaSO₄ 0.1, Na₂MoO₄ 0.002, K₂HPO₄ 0.4, 摇瓶装量 150ml/500ml 三角瓶, 发酵液起始 pH6.5—7.0。发酵周期 2—3 天, 海藻酸产量和蔗糖转化率分别达到 8.25g/L 和 413.6mg 海藻酸/g 消耗的蔗糖。

关键词 维氏固氮菌, 海藻酸

海藻酸是维氏固氮菌在富碳无氮培养基中产生的胞外多糖^[1], 它和海藻中提取的海藻酸的分子结构基本相似^[2]。海藻酸及其盐类用途十分广泛^[3], 用细菌发酵生产海藻酸不受地理环境和气候条件的限制和影响, 可以实现控质控量化生产。国外关于细菌源海藻酸的研究较多^[1,2,4—6], 试图以细菌源海藻酸替代或部分替代海藻源海藻酸。

维氏固氮菌是自生固氮菌, 可以利用大气中的氮气, 发酵时不需添加氮源, 而且发酵中不易受污染, 这对海藻酸生产降低成本具有重要意义。

许多研究表明, 维氏固氮菌产海藻酸的能力随菌株和发酵条件的不同而有很大差异^[1,7—10], 本文报道诱变株 *Y1047* 海藻酸发酵的最佳条件。

1 材料和方法

1.1 菌株和培养条件

维氏固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*) *Y1047* 诱变株, 系维氏固氮菌 342 菌株经 γ 射线照射诱变, 筛选所获。斜面培养基和种瓶培养基按文献^[11], 摇瓶发酵基础培养基见文献^[9]。培养温度 30℃, 摇床转速 200r/min, 工艺流程为: 斜面 $\xrightarrow{2\text{天}}$ 种瓶 $\xrightarrow{\text{振荡 1天}}$ 发酵 $\xrightarrow{\text{振荡 3天}}$ 测定^[8]。

1.2 测定方法

残糖量(g 干重/L 发酸液)按蒽酮法^[12]测定并推算蔗糖转化率(mg 海藻酸/g 消耗的蔗糖); 细胞生长量(g 干重/L 发酵液)和它的海藻酸产量(g 干重/L 发酸液)按文献^[7,8]方法测定。

^{*} 浙江省自然科学基金资助项目。

^{**} 周龙云 1992 年毕业生, 叶旭红 1991 年毕业生。

本文于 1992 年 12 月 14 日收到。

2 结果和讨论

2.1 蔗糖浓度的影响

结果见图 1。当蔗糖小于 25g/L 时, 维氏固氮菌 Y1047 的细胞生长量、海藻酸产量和蔗糖转化率均随蔗糖浓度的提高而较大幅度的递增。蔗糖为 25g/L 时, 三种参数均达到最大值, 分别为 5.1g 细胞/L 发酵液、8.47g 海藻酸/L 发酵液和 414.5mg 海藻酸/g 消耗的蔗糖。蔗糖大于 25g/L 时, 则三种参数随蔗糖浓度升高而较明显地递减。结果说明, 维氏固氮菌 Y1047 诱变株细胞生长、海藻酸合成和蔗糖转化所要求的蔗糖最佳浓度为 25g/L。该菌株的产海藻酸能力和蔗糖转化率均比以前报道的菌株^[7,8,10]有明显的提高。

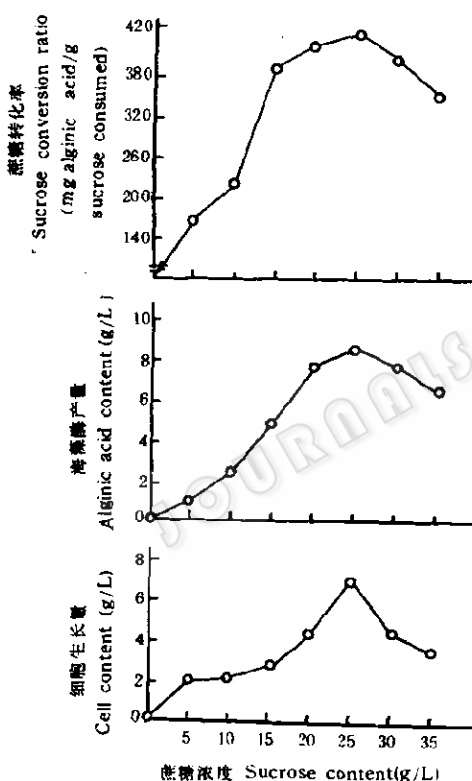


图 1 蔗糖浓度对海藻酸发酵的影响

Fig. 1 Effects of sucrose content on alginic acid-production
by *A. vinelandii* Y1047

2.2 四种盐类及其浓度的影响

试验结果表明, NaAc 为 0.5—1.5g/L 时, 随其浓度的提高, 维氏固氮菌 Y1047 的细胞生长量、海藻酸产量和蔗糖转化率均逐渐增大; NaAc 为 1.5—2.0g/L 时, 三种参数保持恒定。CaSO₄ 对细胞生长和蔗糖转化有轻微刺激作用, 随其浓度的提高而缓慢递增; 它对海藻酸产量的影响如下: 0.025—0.10g/L 时, 随其钙浓度的升高而递增; 0.10—0.15g/L 时, 则随钙浓度的升高而递减。Na₂MoO₄ 表现出细胞生长量随 MoO₄²⁻ 浓度 (0.002—0.008g/L) 的升高而缓慢递增; 而对海藻酸产量和蔗糖转化的刺激作用只发生在较低浓度 (0.002g/L)。K₂HPO₄ 对三种参数均存在一定的刺激作用, 即随浓度 (0.4—1.0g/L) 升高而缓慢递增; 海藻酸产量最高时所要求的 K₂HPO₄ 浓度虽是 0.8g/L, 但影响很小。从而说明, K₂HPO₄ 浓度在 0.4—0.8g/L 范围内均能满足维氏固氮菌 Y1047 生长和代谢对磷、钾的需求。

2.3 酵母膏的影响

添加与不添加酵母膏对三种参数的影响非常明显 (表 1)。但对细胞生长影

响相对较小; 海藻酸产量和蔗糖转化率随酵母膏浓度的提高而递增的幅度较大, 但当酵母膏浓度大于 1.0g/L 时, 递增幅度明显减小。

2.4 摇瓶装量的影响

结果见表 2。装量为 50—150ml 时, 维氏固氮菌 Y1047 的细胞生长量和海藻酸产量随

装量的增加而小幅度递增;装量为 150—200ml 时则递减。装量对蔗糖转化率的影响很小,随装量增加而稍有递增。结果说明,装量 150ml 对三种参数最为理想。

表 1 酵母膏对海藻酸发酵的影响

Table 1 Influences of yeast extract on alginic acid-production by *A. vinelandii* Y1047

酵母膏浓度 Yeast exrtact content (g/L)	0	0.25	0.5	1.0	1.5
细胞生长量 Cell content (g/L)	4.46±0.31	5.01±0.38	5.45±0.49	5.56±0.45	5.61±0.43
海藻酸产量 Alginic acid content(g/L)	4.81±0.45	7.14±0.54	8.01±0.61	8.37±0.67	8.39±0.74
蔗糖转化率 (mg 海藻酸/g 消耗蔗糖) Sucrose conversion ratios (mg alginic acid/g sucrose consumed)	278±11	362±14	392±24	419±26	418±37

2.5 起始 pH 的影响

结果见图 2。pH5.5—6.5 时,海藻酸产量和蔗糖转化率均随 pH 的升高而递增;pH 6.5—8.0 时,其变化规律正好相反; pH6.5 时,两个参数均达到最大值,分别为 8.08g 海藻酸/L 发酵液和 417mg 海藻酸/g 消耗的蔗糖。pH5.5—7.5 时,细胞生长量随 pH 升高而递增;pH 7.5—8.0 时,则相反。从有利于提高海藻酸产量的角度出发,发酵液起始 pH 宜采用中性或偏酸性。这与我们以前报道的菌株^[8,10]相似。

2.6 发酵周期

分批振荡培养 6 天的结果(图 3)表明,维氏固氮菌 Y1047 细胞生长量在 3 天内呈对数增加;4—5 天时缓慢增加;5—6 天时缓慢减少,其原因可能是由于部分细胞开始自溶。海藻酸产量的变化规律与细胞生长量相似,只是海藻酸产量比细胞生长量大得多,这与我们以前报道的菌株有相似的变化规律^[8,10];第 3 天海藻酸产量达到最大值(8.25g 海藻酸干重/L 发酵液)。蔗糖浓度在发酵 1 天后就快速下降;发酵 4 天时,培养基中蔗糖几乎为维氏固氮菌所耗尽。从以上三个因素考虑,该菌株的发酵周期应以 2—3 天为宜。结果还表明发酵过程中 pH 值变化幅度很小。

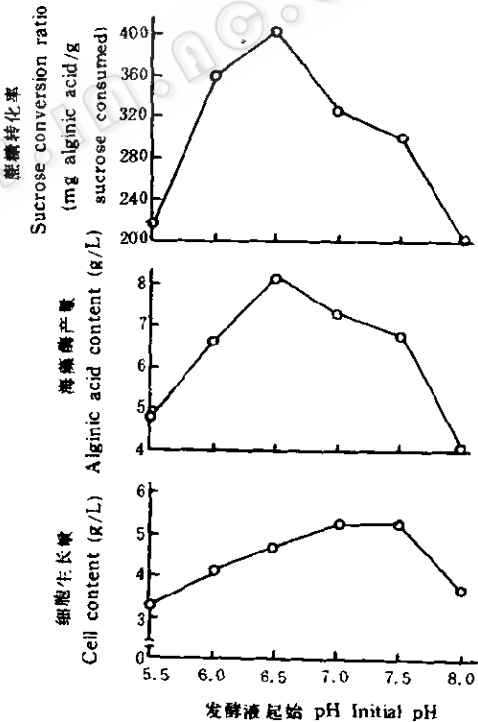


图 2 发酵液起始 pH 对海藻酸发酵的影响

Fig. 2 Effects of initial pH in cultural broths on alginic acid-production by *A. vinelandii*

表 2 摇瓶装量对海藻酸发酵的影响

Table 2 Influences of broth volume in 500ml flask
on alginic acid-production by *A. vinelandii* Y1047

摇瓶装量 (ml/500ml 三角瓶) Broth volume in 500ml flask	50	100	150	200
细胞生长量 Cell content (g/L)	5.43±0.28	5.65±0.32	5.86±0.43	5.78±0.55
海藻酸产量 Alginate content(g/L)	6.18±0.35	6.95±0.47	8.07±0.82	7.63±0.71
蔗糖转化率 (mg 海藻酸/g 消耗的蔗糖) Sucrose conversion ratios (mg alginate/g sucrose consumed)	323±8	379±22	409±21	398±19

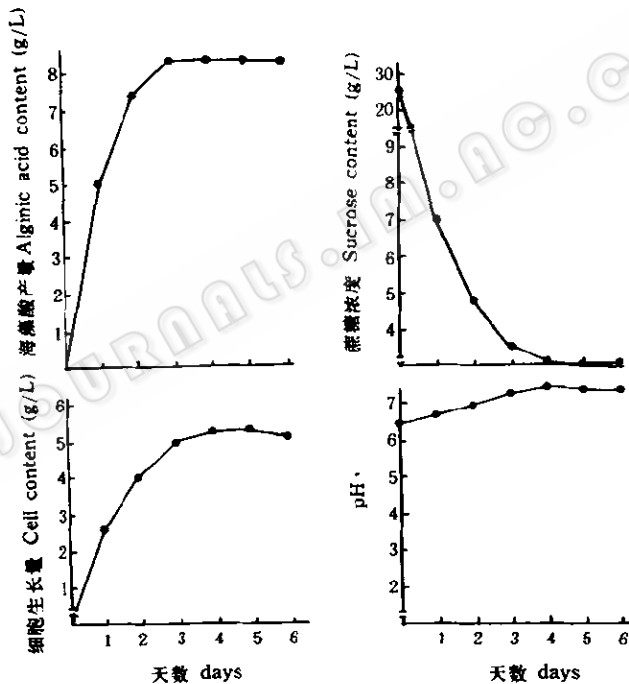


图 3 发酵过程中主要参数的变化

Fig. 3 The changes of main parameters during fermentation by *A. vinelandii*

海藻酸产量和细胞的生长并不是完全同步增加的。研究中发现,两者所要求的条件也不完全相同,这正说明了海藻酸发酵中各种酶的活性受发酵条件影响程度不同所致^[13,14],而 Horan 等^[14]提出 3 种关键性酶的作用。关于在海藻酸合成代谢中如何通过发酵条件的改变来进行调控的,有待进一步研究。

本文做了影响海藻酸产量的发酵条件的研究;贾小明、陈声明等^[9]曾做过影响海藻酸

质量的发酵条件的研究。从而说明可以通过改变海藻酸发酵条件来实现提高产量、改进质量的目的。这也是细菌源海藻酸生产比海藻源海藻酸生产的优越性所在。

研究中还发现发酵液的终 pH 值、颜色和粘性与海藻酸产量有一定的关联。通常是发酵液呈中性或偏酸性时, 海藻酸产量就高; 过酸或过碱时, 产量就低; 发酵液颜色呈浅黄色或茭黄色时, 海藻酸产量就高, 偏褐色或颜色太浅时, 则产量就低; 发酵液粘稠, 海藻酸产量就高, 粘性小则产量偏低。我们认为这 3 项指标在海藻酸工业化生产中也将会有参考价值。

致谢 本研究得到钱泽澍教授悉心指导, 在此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] Jarman T R et al. *J General Microbiol*, 1978, 107: 59—64.
- [2] Huang A et al. *Carbohydr Res*, 1971, 17: 287—296.
- [3] 陈正霖, 等. 褐藻酸, 青岛: 青岛海洋出版社, 1989. 239—295.
- [4] Brack G S et al. *Carbohydr Res*, 1985, 139: 273—283.
- [5] Anaisson G et al. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1986, 25: 55—61.
- [6] Chen Wenpin et al. *Appl Environ Microbiol*, 1985, 49 (3): 543—546.
- [7] 陈声明, 等. 浙江农业学报, 1990, 2 (3): 117—121.
- [8] 陈声明, 等. 浙江农业大学学报, 1991, 17 (3): 307—313.
- [9] 贾小明, 等. 浙江农业大学学报, 1993, 19 (2): 175—178.
- [10] 陈声明, 等. 微生物学杂志, 1992, 12 (2): 18—22.
- [11] Gorin P A T et al. *Can J Chem*, 1966, 44: 993—998.
- [12] 张惟杰主编. 复合多糖生化研究技术. 上海: 上海科学技术出版社, 1987. 7—73.
- [13] Couperwhite L et al. *Arch Microbiol*, 1974, 97: 73—80.
- [14] Horan N T et al. *J General Microbiol*, 1981, 127: 185—191.

STUDIES ON THE OPTIMUM CONDITIONS OF ALGINIC ACID-PRODUCING BY *AZOTOBACTER VINELANDII* 71047

Chen Shengming Jia Xiaoming Zhou Longyun

Ye Xuhong Dong Danru

(Department of Environment Science, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029)

Abstract Influences of conditions on alginic acid-producing by *Azotobacter vinelandii* 71047 were studied at 30°C and 200r/min. The optimum conditions were indicated as follows: sucrose, 25 g/L; yeast extract, 1.0g/L; NaAc, 1.5 g/L; CaSO₄, 0.1g/L; Na₂MoO₄, 0.002g/L; K₂HPO₄, 0.4g/L; 150ml broth /500ml flask; initial pH 6.5—7.0 and fermentation time 2—3 days. The results showed that the yield of alginic acid was up to 8.25g/L and the ratio of sucrose conversion was up to 413.6mg alginic acid when 1 g sucrose was consumed under the optimum conditions above mentioned.

Key words *Azotobacter vinelandii*, Alginic acid