

溶解氧对黄单胞菌S-152产生胞外多糖的影响

江伯英 王绮文 吴珊根 周峰云 赵启瑞

(山东大学微生物研究所, 济南)

黄单胞菌是目前用于生产细菌多糖的优良菌种^[1, 2]。它是一种好气性细菌, 在发酵生产时受溶解氧的影响较大, 但它的溶氧要求, 未见详细报道。在发酵生产高粘度的产品时, 通用式机械搅拌发酵罐很不适用, 国外在改进高粘度生物反应器方面已做了不少工作^[3, 4], 但多数涉及商业性生产问题, 未曾公开发表。我国近年来也开始研制适用于高粘度的生物反应器, 其中的关键问题之一是如何增进发酵液的溶解氧。因此, 研究黄单胞菌对溶氧的要求, 是研制新型反应器所必不可少的基础工作。本文就此进行了试验。

材料和方法

(一) 菌种和培养基

1. 菌种: 野油菜黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris* S-152), 本所保存。

2. 种子培养基: 酵母麦芽汁培养基^[5]。

3. 发酵培养基(g): 淀粉40, 鱼粉蛋白胨4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1.5, 自来水1000ml, pH7.0

(二) 培养条件

1. 旋转摇瓶机: 140 (250ml 瓶) 和 200 (500ml 瓶) rpm。

2. 50L 发酵罐: 通用式机械搅拌罐为 2 个 6 平叶式涡轮搅拌器, 单管通风, 夹层电热保温的不锈钢罐。通风式发酵罐下部装有十字形多孔空气分布器, 无搅拌, 其他形式均同通用式。

(三) 测定方法

1. 粘度: 用 LVT 型 Brookfield 粘度计测定。

2. 丙酮酸含量: 按文献^[6]的酶法测定, 乳酸脱氢酶为 Sigma (USA) 产品。

3. 溶解氧的测定: 亚硫酸钠法^[7]。

4. 红外光谱分析: 用美国 Nicolet 公司的

FT-IR 光谱仪 (5DX)。

(四) 多糖的提取

发酵液用 3 倍酒精提取。

结果和讨论

(一) K_d 值与多糖产率

1. 摇瓶 K_d 值的测定: 测定 K_d 值是通常用以计算溶氧速率的方法, 其单位为 $[mol O_2 / ml \cdot min \cdot P]$, 即在大气压下每毫升发酵液在每分钟内氧的溶解数量。摇瓶装量不同, 转速不同, 其溶氧速率也不同。本试验是在 140rpm 和 200rpm 转速, 温度 30℃, 常压下 ($P = 1$) 测定, 其结果见表 1。

表 1 摇瓶的 K_d 值

摇床转速 (rpm)	三角瓶装液量 (ml)	K_d 值 ($mol O_2 / ml \cdot min \cdot P$) $\times 10^{-7}$
140	100	1.828
	140	1.468
	180	0.073
200	50	2.583
	70	2.229
	90	2.063

黄单胞菌是好气性细菌, 对溶解氧有较严格的要求, 当摇瓶 $K_d < 1.468 \times 10^{-7}$ 时, 在 4% 淀粉培养基中培养 3 天后, 仍有残留淀粉, 而在同样的培养基中, $K_d = 2.583 \times 10^{-7}$ 时, 培养 15h, 淀粉全部被液化 (加碘液不显蓝色)。在不同 K_d 值时, 摇瓶培养的多糖产率见表 2。

从表 2 中可以明显地看到, 低 K_d 值培养时, 多糖产率低。 K_d 值为 0.073 时培养 3 天, 多糖产率仅 0.99%, 在相同条件下, K_d 值为 2.583 时, 多糖产率为 2.78%, 两者相差约 3 倍左右。

本文于 1987 年 6 月 29 日收到。

表 2 不同 K_d 值时摇瓶的多糖产率

K_d 值 ($\times 10^{-7}$)	多糖产率% (W/V)		
	2 天	3 天	4 天
0,073	0.93	0.99	1.23
1,468	1.05	1.12	1.63
1,828	1.14	1.63	1.85
2,063	1.33	1.87	2.18
2,229	1.86	2.14	2.35
2,583	2.64	2.78	2.62

2. 50L 发酵罐 K_d 值的测定: 50L 发酵罐有通风搅拌和机械搅拌通风两种类型, 前者只通风, 利用气流使液体翻腾, 后者通风加搅拌。搅拌转速为 300rpm。装液量都是 30L, 于 30℃, 常压下测定 K_d 值结果见表 3。

表 3 50L 发酵罐的 K_d 值

发酵罐类型	通风量 (L/min)	K_d 值 ($\times 10^{-7}$)
通气罐	30	1.61
	75	3.17
通气加搅拌罐	15	2.98
	30	4.46

在上述两种类型发酵罐中, 培养基的装量均为 30L, 接种量为 5%, 30℃ 培养 3 天, 提取多糖, 计算其产率, 结果见表 4。

表 4 50L 发酵罐的多糖产率

发酵罐类型	K_d 值 ($\times 10^{-7}$)	多糖产率% (W/V)
通气罐	1.61	0.92
	3.17	2.12
通气加搅拌罐	2.98	1.90
	4.46	2.44

从表 4 中可以看到, K_d 值高, 多糖产率也高。但与摇瓶相比较, 在相近的 K_d 值时, 多糖的产率比摇瓶低。其原因可能是由于发糖过程中多糖不断产生, 溶液粘度逐渐增大, 搅拌通气效果减弱, 导致溶氧降低所引起的。在摇瓶中, 溶氧效率相对稳定, 所以多糖产率比发酵罐高。

(二) 多糖的粘度与剪切速率

不同 K_d 值摇瓶培养的发酵液, 以酒精提取出多糖, 均配成 1.5% 的浓度, 测定粘度与剪切速率的关系, 结果见图 1。

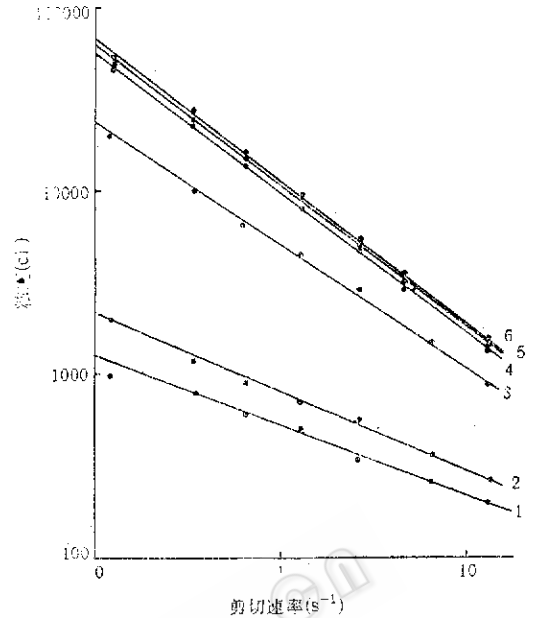


图 1 多糖粘度与剪切速率

摇瓶 K_d 值 ($\times 10^{-7}$):

1. 0,073 2. 1,468 3. 1,828
4. 2,063 5. 2,229 6. 2,583

从图 1 可看出, 低 K_d 值培养所得的多糖粘度低, 剪切性能差。当 K_d 值在 2×10^{-7} 以上时, 其粘度与剪切性能很相近, 这表明低 K_d 值发酵的多糖, 其分子结构上与正常的多糖有明显的不同之处。

(三) 多糖的丙酮酸含量

黄单胞菌多糖分子侧链末端含有一定量的丙酮酸基团, 此基团的多少, 对多糖的性能有很大影响。在不同溶氧条件下发酵所得的多糖, 其丙酮酸含量有明显差异。低 K_d 值下发酵所得的多糖, 其丙酮酸含量低, 发酵液的粘度也低, 这可能是在低溶氧条件下, 菌的代谢水平低下有关。

表 5 多糖的丙酮酸含量

摇瓶 K_d 值 ($\times 10^{-7}$)	培养液粘度 (cP)	丙酮酸含量 (%)
0,073	140	1.75
1,468	640	2.17
1,828	3820	3.08
2,063	6020	3.86
2,229	6920	3.92
2,583	7280	4.10

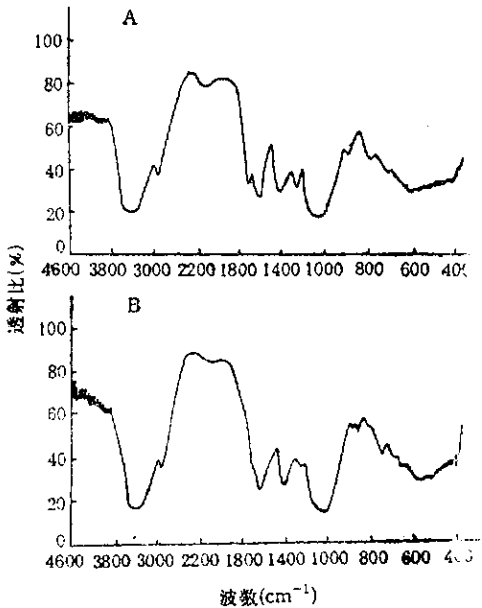


图2 多糖红外光谱图(摇瓶多糖)

A. $K_d = 0.073 \times 10^{-7}$ B. $K_d = 2.583 \times 10^{-7}$

(四) 红外光谱分析

取 K_d 值为 0.073×10^{-7} (图2-A)和 2.583×10^{-7} (图2-B)培养所得的多糖,进行红外光谱测定,结果见图2。图2-B的波峰与正常的黄原胶相同,两图相比较,在波数1000—1800范围有明显差异,可见两种多糖在结构上有某种不同。

从上述结果看来,溶解氧对黄单胞菌发酵产生多糖有显著的影响。在低溶氧条件下,不仅多糖的产率低,而且所产生的多糖在分子结构上也有明显差异,这对黄单胞菌多糖的生产给予重要启示。至于产生这些现象的生理机制,还需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Kang, K.S. & Cottrell, I.W., Microbial Tehnology Vol. 1, ed. by Pepler, H.J. pp.417, 1979.
- [2] Kennedy, J.F. & Bradshaw, I.J., Progress in Industrial Microbiology, Vol. 19, ed. by Bushell, M.E. pp.319, 1984.
- [3] Margaritis, A. & Zajic, J.E., Biotech. and Bioeng., 20:939, 1978.
- [4] U.S. Patent, 4218538, Aug. 19, 1980.
- [5] Haynes, W.C., et al., Appl. Micorobiol., 3:361, 1955.
- [6] Duckrooth, M. and Yaphe, W., Chemistry and Industry, 23:747, 1970.
- [7] Cooper, C.M., Industrial and Engineering Chemistry, 36:505, 1944.

EFFECT OF DISSOLVED OXYGEN ON PRODUCTION OF POLYSACCHARIDES BY XANTHOMONAS CAMPESTRIS S-152

Jiang Boying Wang Qiwen Wu Shangen Zhou Fengyun Zhao Qirui
(The Institute of Microbiology, Shandong University, Jinan)

When the polysaccharides were produced by *Xanthomonas campestris* S-152, the demand of dissolved oxygen has been studied. The productivity of polysaccharides, the correlation of viscosity and shear rate, the content of pyruvic acid and the viscosity of culture broth under different K_d value are tested. Experiments show that the quality of polysaccharides is delined, if the K_d value is less than 1.828×10^{-7} , and the quality is normal where the K_d value is in the range $2.063-2.587 \times 10^{-7}$.

Key words

Xanthomonas campestris; xanthan; K_d value; dissolved oxygen