

文章编号 :1009-038X(2004)05-0016-05

Klebsiella oxytoca XCH-1 菌产胞外粗多糖发酵

刘红英^{1,2}, 薛长湖², 王 琦², 李兆杰²

(1. 河北农业大学 水产学院, 河北 秦皇岛 066003 ;2. 中国海洋大学 食品科学与工程系, 山东 青岛 266003)

摘 要 :从青岛海藻化工厂海带浸泡液中分离得到 *Klebsiella oxytoca* XCH-1 菌,研究了 *Klebsiella oxytoca* XCH-1 菌产胞外多糖的摇瓶发酵情况,探讨了培养基中碳源、氮源、起始碳源质量浓度、碳氮比、温度、初始 pH 值、种龄、接种量、装液量等因素对 *Klebsiella oxytoca* XCH-1 菌产生胞外多糖的影响.结果表明,最适宜条件为:以甘露醇为碳源,硫酸铵为氮源,起始甘露醇质量浓度为 3 g/dL,碳氮质量比为 150: 1,温度 28 ℃,初始 pH 值 7~8,种龄 54 h,接种体积分数 8%,250 mL 摇瓶装液量为 40 mL,并保持良好的供氧条件.

关键词 :*Klebsiella oxytoca* XCH-1 ;胞外多糖 ;发酵

中图分类号 :TQ 920.6

文献标识码 :A

A Preliminary Study on the Exopolysaccharide Production from the Fermentation of *Klebsiella oxytoca* XCH-1

LIU Hong-ying^{1,2}, XUE Chang-hu², WANG Qi², LI Zhao-jie²

(1. Fisheries College, Agriculture University of Hebei, Qinhuangdao 066003, China ;2. Department of Food Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract :*Klebsiella oxytoca* XCH-1 strain was isolated from water extract of *Laminaria japonica*. The paper reports the preliminary study on the exopolysaccharide production from *Klebsiella oxytoca* XCH-1 in shaking flasks. The effects of exopolysaccharide production on the medium carbon source, nitrogen source, initial pH, initial mannite concentration, the ratio of the carbon and nitrogen, the temperature, the seed age, the inoculation quantity, and aeration (the medium volume in a flask) were investigated. The optimum conditions for exopolysaccharide production were as follows: temperature of 28 ℃, initial pH of 7~8, using mannite as the carbon source and (NH₄)₂SO₄ as the nitrogen source, C:N ratio of 150: 1, initial mannite concentration of 3%, seed age of 54 h, inoculation quantity of 8%, and 40 mL medium in a 250 mL flask.

Key words :*Klebsiella oxytoca* XCH-1 ;exopolysaccharide ;fermentation

微生物多糖是某些细菌、真菌和蓝藻类产生的多糖^[1].按其分布在微生物细胞的部位不同可分为细胞内多糖、细胞壁多糖和细胞外多糖^[2].微

生物多糖因其安全无毒、理化性质独特等优良性质而倍受关注^[1].微生物胞外多糖是由微生物产生的多糖,易与菌体分离,可通过深层发酵实现工

收稿日期 2003-10-20 ; 修回日期 2003-12-18.

基金项目 : 863 青年基金项目(2001 AA625030)资助课题.

作者简介 : 刘红英(1962-),女,河北秦皇岛人,副教授,水产品加工贮藏专业博士研究生.

业化生产^[2]. 近年来,微生物胞外多糖作为一类新型的发酵产品,因其独特的物化性质,已作为乳化剂、增稠剂、稳定剂、胶凝剂、悬浮剂和润滑剂等应用于石油、化工、食品和制药等多个领域^[3]. 据 D. E. Eveleigh 统计,有 49 属 76 种微生物产生胞外多糖,但真正有应用价值并已进行或接近工业化生产的仅有十几种,人们只对其中少数作了研究,并证明微生物胞外多糖具有植物多糖不具备的优良性质,它们生产周期短,不受季节、地域和病虫害条件限制,具有较强的市场竞争力和广阔的发展前景. Ryosuke Sugihara 等人将 *Klebsiella oxytoca* TMN3 菌发酵获得胞外多糖 AZ-9,研究了该糖对胶原质诱发的 DBC/1 小鼠关节炎的抑制作用^[5]. Franco Baldi 等人分离得到的 *Klebsiella oxytoca* BAS-10 具有较强的耐受重金属的能力^[6]. Weidong Cui 曾研究 *Klebsiella oxytoca* WCSLH 胞外多糖具有较强的脱除 Pb²⁺、Cd²⁺ 的能力^[7]. 作者从青岛海藻化工厂海带浸泡液中分离得到 *Klebsiella oxytoca* XCH-1 菌,该菌在其生长过程中产生大量粘性的胞外粗多糖,作者对 *Klebsiella oxytoca* XCH-1 菌产胞外粗多糖的发酵作了初步研究.

1 材料与方法

1.1 菌种

中国海洋大学食品科学与工程系从青岛海藻化工厂海带浸泡液中分离获得,经鉴定为 *Klebsiella oxytoca* XCH-1 菌.

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基 (组分 g/L): 甘露醇 10,酵母膏 0.4, K₂HPO₄ 0.5, MgSO₄ 0.2, MgCl₂ 0.2, CaCO₃ 1.0, 琼脂 15. pH 值 7.0~7.2.

1.2.2 基础培养基 (组分 g/L): 甘露醇 10,酵母膏 0.4, K₂HPO₄ 0.5, MgSO₄ 0.2, MgCl₂ 0.2, CaCO₃ 1.0. pH 值 7.0~7.2.

1.3 培养条件

斜面菌种在恒温生物培养箱内于 28℃ 培养 48 h,用 30 mL 灭菌蒸馏水荡洗,作为摇瓶发酵的种子. 将种子以体积分数 10% 的接种量接入发酵基础培养基中,在回转式摇床上振荡培养 48 h. 摇床转速 130 r/min,温度 28℃,250 mL 的锥形瓶培养基装液量为 40 mL.

1.4 实验仪器

ZD-2 型自动电位滴定仪:上海大普仪器有限公司制造;无菌操作台:苏净集团安泰公司制造;TGL-16G 台式离心机:上海安亭科学仪器厂制造;

721 分光光度计:上海精密科学仪器有限公司制造.

1.5 分析方法

1.5.1 pH 值 发酵液直接用 ZD-2 型自动电位滴定仪测定.

1.5.2 残糖量的测定 过碘酸氧化法^[8]测定剩余甘露醇含量.

1.5.3 菌浓的测定 1 mL 发酵液加 2 mL 蒸馏水稀释,用 721 分光光度计于 640 nm 处测其 OD 值.

1.5.4 *Klebsiella oxytoca* XCH-1 菌胞外多糖的制备与测定 发酵液用高速离心机以 10 000 r/min 转速离心后去沉淀,收集上清液,加入 3 倍体积的体积分数 95% 乙醇沉淀,静置数小时后离心,收集沉淀物,60℃ 干燥至恒重,即得胞外粗多糖. 准确称量所得胞外粗多糖的质量,经换算得胞外粗多糖产量^[9,10].

2 结 果

2.1 碳源对 *Klebsiella oxytoca* XCH-1 胞外粗多糖产量的影响

2.1.1 不同碳源对 *Klebsiella oxytoca* XCH-1 胞外粗多糖产量的影响 根据菌种来源,在摇瓶发酵培养基中分别以甘露醇、葡萄糖、蔗糖作为碳源,考察不同碳源对发酵过程产胞外粗多糖的影响,测定胞外粗多糖的产量,结果见表 1. 从表 1 可看出 *Klebsiella oxytoca* XCH-1 对 3 种糖均可以利用,但甘露醇作为碳源最好,葡萄糖次之,蔗糖最次. 因而确定甘露醇为最佳碳源,如考虑工业生产可选用葡萄糖作为碳源.

表 1 不同碳源对胞外粗多糖产量的影响

Tab. 1 The influence of different carbon sources on the yield of exopolysaccharide

碳 源	胞外粗多糖产量/(mg/g)
葡萄糖	0.98
甘露醇	1.19
蔗糖	0.92

2.1.2 碳源含量对 *Klebsiella oxytoca* XCH-1 胞外粗多糖产量的影响 在摇瓶发酵基础培养基中,以甘露醇为碳源,考察不同甘露醇质量浓度对发酵过程产胞外粗多糖的影响. 培养基初始 pH 值 7.0~7.2,甘露醇初始质量浓度分别为 1,1.5,2.0,2.5,3.0,3.5,4.0 g/dL,结果见表 2. 可以看出,随着甘露醇质量浓度的增加,发酵终止 pH 值稍有降低. 残糖量、胞外粗多糖的产量都随着初始糖质量浓度的增大而提高. 糖质量浓度过高时胞外粗多糖产量反而下降,菌体生长受到抑制,残糖

量高. 甘露醇质量浓度太高和太低都不利于胞外粗多糖产量的提高, 这可能是碳源含量较低时, 培养基质用于生长菌体的比例增加, 菌体生长繁殖消耗了较多的碳源. 而碳源含量较高时, 发酵后期溶氧限制了产物 *Klebsiella oxytoca* XCH-1 胞外粗多糖的合成, 故选择甘露醇初始质量浓度为 3.0 g/dL.

表 2 初始甘露醇质量浓度对胞外粗多糖产量的影响
Tab.2 The effect of initial mannite concentrations on the yield of exopolysaccharide

甘露醇质量浓度/(g/dL)	终止 pH 值	残糖质量浓度/(g/dL)	胞外粗多糖产量/(mg/g)
1.0	6.26	0.71	0.98
1.5	6.24	1.11	1.22
2.0	6.22	1.45	1.27
2.5	6.11	1.64	1.22
3.0	6.15	1.87	1.75
3.5	6.04	1.88	1.11
4.0	6.04	1.87	1.05

2.2 氮源对 *Klebsiella oxytoca* XCH-1 胞外粗多糖产量的影响

摇瓶基础培养基中甘露醇质量浓度为 3.0 g/dL, 将发酵基础培养基中的氮源分别换成大豆蛋白胨、酵母膏、硝酸钾、硫酸铵、空气(N₂), 培养基初始 pH 值 7.0 ~ 7.2, 测定胞外粗多糖的产量, 考察不同氮源对发酵过程产 *Klebsiella oxytoca* XCH-1 胞外粗多糖的影响, 结果见表 3. 从表 3 可以看出, 以空气(N₂), 酵母膏、大豆蛋白胨、KNO₃、(NH₄)₂ SO₄ 为氮源, 发酵终止 pH 值、残糖量依次降低, 胞外粗多糖产量依次增加. 以(NH₄)₂ SO₄ 为氮源时, *Klebsiella oxytoca* XCH-1 胞外粗多糖产量最高. *Klebsiella oxytoca* XCH-1 菌在繁殖过程中产酸, 因而会使发酵液 pH 值降低. 实验结果表明, 氮源对胞外粗多糖产量的影响差异较大, 总体而言 *Klebsiella oxytoca* XCH-1 菌对无机氮源的利用优于有机氮源 (NH₄)₂ SO₄ 为最适宜氮源.

表 3 不同氮源对胞外粗多糖产量的影响
Tab.3 The effect of different nitrogen sources on the yield of exopolysaccharide

氮源	终止 pH 值	残糖质量浓度/(g/dL)	胞外粗多糖产量/(mg/g)
N ₂	7.26	1.88	0.63
酵母膏	6.24	1.87	1.22
大豆蛋白胨	6.22	1.94	2.20
KNO ₃	5.98	1.79	2.30
(NH ₄) ₂ SO ₄	4.44	1.71	2.89

2.3 碳氮比对 *Klebsiella oxytoca* XCH-1 胞外粗

多糖产量的影响

在摇瓶基础培养基中以甘露醇为碳源、(NH₄)₂ SO₄ 为氮源, 培养基初始 pH 值 7.0 ~ 7.2, 考察不同碳氮比对发酵过程产 *Klebsiella oxytoca* XCH-1 胞外粗多糖的影响, 测定胞外粗多糖的产量, 结果见表 4. 可以看出, 氮源质量浓度太高或太低时, 胞外粗多糖产量均下降, C: N 质量比为 150: 1 时, 终止 pH 值和残糖量最低, *Klebsiella oxytoca* XCH-1 胞外多糖产量最高. 实验表明 C: N 质量比为 150: 1 比较适宜.

表 4 碳氮比对 *Klebsiella oxytoca* XCH-1 胞外粗多糖产量的影响

Tab.4 The effect of ratio of carbon and nitrogen on the yield of exopolysaccharide

W _{C: N}	终止 pH 值	残糖质量浓度/(g/dL)	胞外粗多糖产量/(mg/g)
5: 1	3.98	1.87	1.38
10: 1	4.06	1.77	1.73
20: 1	4.04	1.70	2.96
50: 1	4.43	1.70	3.27
100: 1	4.20	1.78	3.16
150: 1	3.94	1.52	4.95
200: 1	4.69	1.80	4.42
250: 1	4.67	1.77	3.74

2.4 温度对 *Klebsiella oxytoca* XCH-1 胞外粗多糖产量的影响

在优化的摇瓶发酵培养基的组成情况下, 培养基初始 pH 值 7.0 ~ 7.2, 考察不同温度对发酵过程产 *Klebsiella oxytoca* XCH-1 胞外粗多糖的影响, 测定胞外粗多糖的产量, 结果见表 5. 由表 5 可知, 温度太高或太低时胞外粗多糖的产量均不高, 发酵的最适宜温度为 28 ℃, 此温度下 *Klebsiella oxytoca* XCH-1 胞外粗多糖的产量最高.

表 5 不同温度对胞外粗多糖产量的影响
Tab.5 The effect of different temperature on the yield of exopolysaccharide

温度/℃	终止 pH 值	残糖质量浓度/(g/dL)	胞外粗多糖产量/(mg/g)
20	5.58	1.86	3.05
25	5.25	1.80	4.18
28	3.94	1.52	4.95
30	4.62	1.85	2.67
35	4.40	1.85	1.64

2.5 初始 pH 值对 *Klebsiella oxytoca* XCH-1 胞外粗多糖产量的影响

在优化的摇瓶发酵培养基的组成情况下,考察培养基初始 pH 值对发酵过程产 *Klebsiella oxytoca* XCH-1 胞外粗多糖的影响,结果见表 6。由表 6 可知,初始 pH 值应控制在 7~8 为宜,在此条件下 *Klebsiella oxytoca* XCH-1 胞外粗多糖的产量最高。

表 6 不同初始 pH 值对胞外粗多糖产量的影响
Tab.6 The effect of different starting pH on the yield of exopolysaccharide

起始 pH 值	终止 pH 值	残糖质量浓度/(g/dL)	胞外粗多糖产量/(mg/g)
5.0	3.54	1.82	1.84
6.0	5.00	1.79	1.94
7.0	4.88	1.84	4.41
8.0	5.12	1.83	4.40
9.0	5.22	1.81	3.30
10.0	6.54	1.95	2.82

2.6 种龄和接种量对 *Klebsiella oxytoca* XCH-1 胞外粗多糖产量的影响

在优化的摇瓶发酵培养基组成情况下,考察种龄和接种量对摇瓶发酵的影响,结果见表 7。由表 7 可知,种龄 54 h,接种体积分数为 8% 时胞外粗多糖产量较高。

2.7 装液量对 *Klebsiella oxytoca* XCH-1 胞外粗多糖产量的影响

在优化的摇瓶发酵培养基组成情况下,250 mL 三角瓶内培养基装液量分别为 40、60、80、120 mL 时,考察不同装液量对摇瓶发酵的影响(发酵时间 48 h),结果见表 9。可以看出,培养基的装液量减少,产糖量增加,说明 *Klebsiella oxytoca* XCH-1 菌产胞外多糖为好氧发酵,适当增加通气量有利于发酵。

表 7 种龄对胞外粗多糖产量的影响(接种体积分数 10%)
Tab.7 The effect of the seed age on the yield of exopolysaccharide(inoculation quantity 10%)

种龄/h	终止 pH 值	残糖质量浓度/(g/dL)	胞外粗多糖产量/(mg/g)
24	4.78	1.82	2.05
36	4.94	1.85	2.42
42	4.94	1.87	2.52
48	4.69	1.80	2.93
54	4.94	1.82	4.42
60	4.95	1.82	2.56

万方数据

表 8 接种体积分数对胞外粗多糖产量的影响
Tab.8 The effect of inoculation quantity on the yield of exopolysaccharide

接种体积分数/%	终止 pH 值	残糖质量浓度/(g/dL)	胞外粗多糖产量/(mg/g)
5	5.69	1.82	3.89
8	5.66	1.73	4.61
10	5.80	1.85	3.84
12	5.80	1.91	3.01
15	5.81	1.87	3.04

表 9 装液量对胞外粗多糖产量的影响
Tab.9 The effect of liquid quantity on the yield of exopolysaccharide

接种体积分数/%	终止 pH 值	残糖质量浓度/(g/dL)	胞外粗多糖产量/(mg/g)
40	4.80	1.84	4.56
60	4.90	1.86	2.51
80	4.76	1.85	2.42
120	4.80	1.87	2.33

2.8 *Klebsiella oxytoca* XCH-1 产胞外粗多糖摇瓶发酵曲线测定

选择优化的发酵培养基进行摇瓶发酵曲线的测定,结果见图 1。

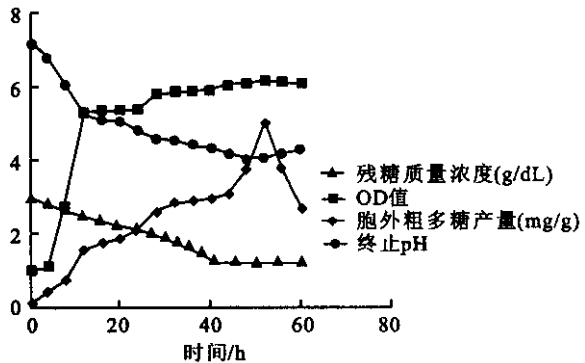


图 1 *Klebsiella oxytoca* XCH-1 菌液体摇瓶发酵曲线
Fig.1 Time-course of *Klebsiella oxytoca* XCH-1 in shaking flask culture

由图 1 可以看出,在发酵过程中,随着发酵时间的增长,pH 值下降较大,因为 *Klebsiella oxytoca* XCH-1 菌在繁殖过程中产酸,因而会使发酵液 pH 值降低,甘露醇质量浓度在发酵前期呈下降趋势,发酵后期趋于平缓,这是由于最初培养基里含有的甘露醇首先被菌体生长所消耗,所以发酵前期甘露醇的质量浓度下降。随着菌体的生长,代谢旺盛,胞外粗多糖产量逐渐增加,发酵液粘度增大,52 h 时胞外粗多糖的产量达到最大,此后胞外粗

多糖产量又有所降低.可以看出,胞外粗多糖的积累主要在 52 h 左右,随着发酵的进行,发酵后期营养物质变得不充足,菌体分泌出的多糖可能又被自身利用,所以胞外粗多糖的产量在 52 h 以后下降,若以胞外粗多糖产量为指标,应选择发酵时间为 52 h.

3 讨 论

Klebsiella oxytoca XCH-1 产胞外多糖摇瓶发酵以甘露醇为最佳碳源,甘露醇的初始质量浓度 3 g/dL,这是由于 *Klebsiella oxytoca* XCH-1 所产胞外粗多糖粘度较大的特性决定的.碳源含量较低时,菌体生长会消耗较多的碳源,而在碳源含量较高时,发酵后期溶氧会限制产物 *Klebsiella oxytoca* XCH-1 胞外粗多糖的合成.

作为多糖生产的氮源,一般来说,有机氮要比无机氮的效果好.氮源的消耗和菌体的生长有相关性,菌体随氮源质量浓度的增加而增加,然而菌体大量增长会消耗很多碳源,多糖收率下降^[11].菌株生产所需要的氮源因种类有所不同,氮源的添加量为菌体增殖所必需的最小量.如果氮源质量浓度过高将促使细胞过量繁殖,因而消耗碳源多而胞外粗多糖产量低.对 *Klebsiella oxytoca* XCH-1 产胞外粗多糖发酵条件的研究表明,该菌利用无机氮源($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3)优于有机氮源(酵母膏,大豆蛋白胨).最佳 C: N 质量比为 150: 1.在培养基中加入过量的糖类能刺激多糖的产生.

参考文献:

- [1] 魏培莲. 微生物胞外多糖研究进展[J]. 浙江科技学院学报, 2002, 14(2): 8-12.
- [2] 浜天信威. 微生物生产的多糖[J]. 应用微生物, 1982(1): 19-24.
- [3] 张明, 陆杨森, 闫新萍, 等. 假单胞菌胞外多糖发酵条件的研究[J]. 微生物学杂志, 1996(5): 20-22.
- [4] 淡家林. 工业微生物多糖的发展前景[J]. 微生物学通报, 1988, 15(1): 35-37.
- [5] Ryosuke Sugihara, Masayasu Yoshimura, Masaharu Mori, et al. Prevention of collagen-induced arthritis in DBA/1 mice by oral administration of AZ-9, a bacterial polysaccharide from *Klebsiella oxytoca*[J]. *Immunopharmacology*, 2000, 49: 325-333.
- [6] Franco Baldi, Andrea Minacci, Milva pepi, et al. Gel sequestration of heavy metals by metals by *Klebsiella oxytoca* isolated from iron ma[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 36: 169-174.
- [7] Weidong Cui. Studies on characterization of polysaccharide from *Klebsiella oxytoca* and enzymatic modification of selected polysaccharides[D]. New York State University of New York, 1996.
- [8] 范晓, 严晓军. 海藻化学分析分法[M]. 北京: 学苑出版社, 1996. 59-62.
- [9] 朱圣东. 黄原胶发酵工艺条件研究[J]. 精细石油化工进展, 2002, 23(2): 41-43.
- [10] 曾嵘涓, 章克昌. 营养因子对鸡腿蘑分泌胞外多糖的影响[J]. 无锡轻工业大学学报, 2002, 21(2): 135-139.
- [11] 吴林森, 蔡顺养. 黄单胞杆菌多糖胶的生产和应用[J]. 应用微生物, 1986(4): 9-17.

在液体培养基中,多糖产生的速率以生长对数期为最大,此后逐渐减少,而多糖的积累量以细胞增长停止后最大.对于 *Klebsiella oxytoca* XCH-1 菌,提高培养基中的碳氮比值,有利于胞外粗多糖的产生.

多糖生产的适宜温度也是微生物生长的适宜温度,或是比生长温度稍低.对于 *Klebsiella oxytoca* XCH-1 菌产胞外粗多糖的发酵来说,适宜温度在 28 ℃ 左右.此外,在培养过程中必须供给充足的氧,尤其是培养后期,因为随着 *Klebsiella oxytoca* XCH-1 胞外粗多糖的积累,粘度提高,氧气的量不足,所以必须有充足的通气量. *Klebsiella oxytoca* XCH-1 胞外粗多糖产量随培养基装入量的减少而增加,正是由于较少的装液量提供了充足的通气量,也说明此发酵为好氧发酵.

一般来说,适于微生物生长的 pH 值也是适用于其胞外粗多糖生产的 pH 值, *Klebsiella oxytoca* XCH-1 菌产胞外粗多糖的发酵最适宜初始 pH 值为 7~8 左右.

综上所述, *Klebsiella oxytoca* XCH-1 菌发酵产生胞外粗多糖受多种因素的影响,如通气量、培养基的起始 pH 以及培养基的营养成分.对于 *Klebsiella oxytoca* XCH-1 菌产胞外粗多糖的发酵,最佳发酵条件为:以甘露醇为碳源,硫酸铵为氮源,起始甘露醇质量浓度为 3 g/dL,碳氮质量比为 150: 1,温度 28 ℃,培养基初始 pH 值 7~8,种龄 54 h,接种体积分数 8%,250 mL 摇瓶装液量为 40 mL.

(责任编辑:李春丽)