

图 1 运动性肌肉细胞内 (图
内的 mBohscdMHL, b10 体 p
) 表明糖原磷酸化酶
磷酸酶是通过还原戊糖
之以氢(为能源, 循环)。
MI 用 10 毫摩尔染色后
速生固冠乙氧化膜而迅
能在糖原量未可达到时
糖物质。

收稿日期: 1995-09-08

1 材料和方法

1.1 菌种

Hydrogenovibrio marinus MH-110 由微生物利用研究室提供

1.2 培养基(g/l)

K_2HPO_4 2.0, KH_2PO_4 1.0, $(NH_4)_2SO_4$ 5.0

NaCl 29.3, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, $CaCl_2$ 0.01

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01, $NiSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0006

微量元素混合液* 2ml/l, pH 6.5

1.3 培养方法及条件

1.3.1 种子培养 10ml 培养基在 100ml 具塞烧瓶中,用 H_2 、 O_2 、 CO_2 以 7 : 1 : 1 的混合气体充气后,37℃ 条件培养 24h 后,取 1ml 接入内装 50ml 培养基的烧瓶中,同样充 H_2 、 O_2 、 CO_2 混合气体。37℃ 培养 12h。

1.3.2 2.0L 台式发酵罐培养 2.0L 发酵罐(东京 Labotech 公司)内装 1.0L 培养液,10% 接种量、搅拌转速 1000r/min,用带热质流量计的台式气体混合器(Ueshima 公司)控制产生 H_2 、 O_2 、 CO_2 混合气体,pH 调控用蠕动泵自动流加。37℃ 培养。发酵装置见图 2。

微量元素混合物液组分:(mg/L)

MaO_3 1.0; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 7.0; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.5

H_3BO_3 1.0; $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 1.0; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 1.0

1.4 分析方法

1.4.1 细胞生长的测定 用浓度法在 540nm 下进行测定。干细胞重量用一个验证过的公式来计算,即 $OD\ 1.0 = 0.471mg$ 干细胞/ml。

1.4.2 溶解氧的测定 用带氧探头的溶解氧分析仪测定。

1.4.3 多糖的测定 用硫酸一酚显色法进行测定^[4]。

1.4.4 糖原的测定 收集细胞,在 100℃ 条件下用 2mol HCl 水解 6h 后,12000r/min 离心 5min 去除碎片,取上清液用玻璃纤维过滤去除一些细小的颗粒,再用 2mol NaOH 中和,加入等量磷酸溶液(pH 7.0),最后用 GOD(葡萄糖氧化酶法)kit(Wako Pure Chemical Ltd)测定葡萄糖含量。

1.5 多糖物质的分离与纯化

见附图。

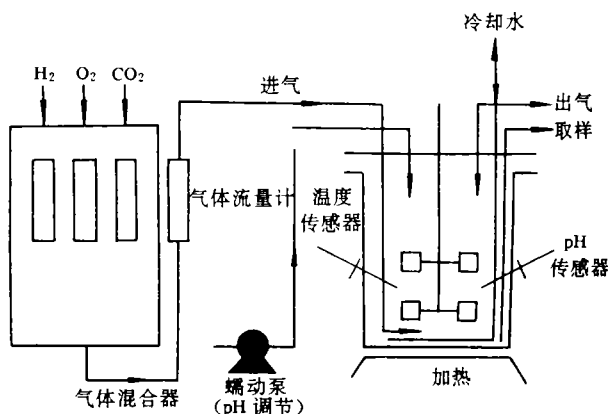


图2 2.0L 发酵罐及发酵装置示意图

2 结 果

2.1 2.0L 发酵罐中 MH-110 的高浓培养

MH-110 是好氧性菌,但由于氢化酶对氧的敏感性,过高的氧对其生长产生抑制作用;MH-110 为海洋微生物,海水中金属离子的含量是微生物生长的重要营养源。作者选择 Fe^{2+} , Mg^{2+} 离子。菌体的生长与溶解氧的消耗情况见图 3。

MH-110 菌在接种后很快进入对数生长期,基本上没有滞后期。培养到 13h,菌体生长到 O.D 值为 4 左右时,就趋于停止,溶解氧的消耗也停止,但尚未消耗殆尽。此时加入 $0.2\text{gFeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (箭头 A 处)。菌体的和溶解氧的消耗又可重新开始。生长到 O.D 值 20 左右,即 9.42g 干细胞/L,培养

时间 30h 就结束。在 Fe^{2+} 离子成为限制性生长因素之前,5h 时加入 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,见图 4。之后生长旺盛,溶解氧消耗迅速。在溶解氧降至 1ppm 左右时,将混合气体组分由 $\text{H}_2 : \text{O}_2 : \text{CO}_2 = 8 : 1 : 1$ 调整到 $7 : 2 : 1$,即增加了发酵液中溶解氧的含量。13h 菌体生长超过 O.D 值 10。之后耗氧和菌体生长又趋于停止。在 16h 加入另一限制性因素 Mg^{2+} ,即 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (箭头 B 处)。菌体生长和耗氧又恢复。在 30h,结束发酵时 O.D 值达 30 以上。菌体得率在 14g/L 。在 5h、7h, Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 成为限制生长因素之前就加入。见图 5。也就是溶

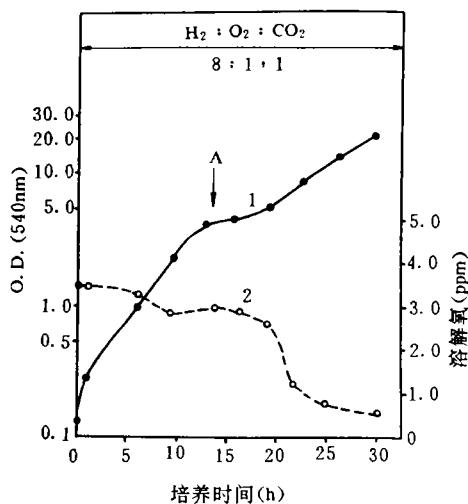


图 3 MH-110 培养过程中 Fe^{2+} 添加菌体生长变化

箭头 A 处,添加 $0.2\text{gFeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

1 表示 O.D 值 2 表示溶解氧

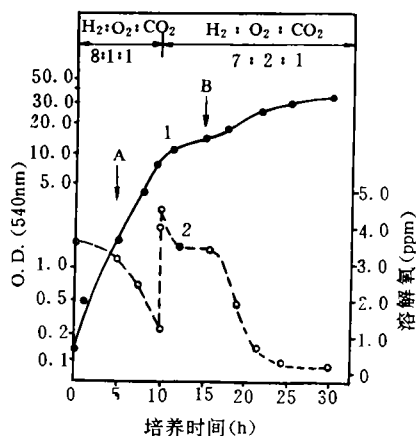


图 4 MH-110 培养过程中 Fe^{2+} 添加与菌体生长变化

箭头 A 处,添加 $0.2\text{gFeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

箭头 B 处,添加 $2.0\text{gFeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

1 表示 O.D 值 2 表示溶解氧

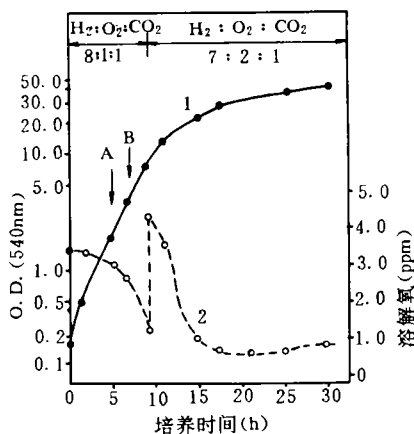


图 5 MH-110 培养过程及添加 Fe^{2+} 、

Mg^{2+} 增加氧气比例与菌体生长

箭头 A 处,添加 $0.2\text{gFeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

箭头 B 处,添加 $2.0\text{gFeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

1 表示 O.D 值 2 表示溶解氧

解氧不低于 1ppm 之前。可见在 9h 溶解氧降至 1ppm. 10h 菌体生长至 O.D 值为 10. 此时, 调整混合气体组份, 增加混合气体中氧的组份。30h 后, 菌体生长可达到 O.D=40, 即 18. 84g 干细胞/L.

2.2 MH-110 培养过程中多糖的生成

在 MH-110 培养过程中, 观察到它可以积累一种多糖物质, 见图 6, 随着菌体生长接近对数后期, 菌体的多糖物质开始生成, 在细胞的平衡期, 多糖物质迅速增长, 40h 时达最高值 5.7 g/L, 占细胞干重的 30.26%.

2.3 多糖物质成分的研究

1) 对开始产生多糖的菌体跟踪取样, 用印度墨水染色镜检, 排除菌体荚膜多糖的可能后。将 1.2L 发酵罐培养的发酵液进行多糖物质的分离和纯化, 得到 1.44g 颗粒物质。

2) 纯化的多糖物质可以溶于水, 在紫外分光光度计上 200nm 至 300nm 间均没有任何吸收。可以排除是核糖和芳香族化合物的可能性。

3) 用 Sepharose CL-4B 凝胶过滤, 从洗脱曲线看出, 在 490nm 下, 有个单一吸收峰, 分子量大约为 5×10^6 道尔顿。

4) 本研究室用 HPLC 和 TCL 分析了水解后的多糖, 证明只有一种成分——葡萄糖, 可以推测为 MH-110 菌体内的糖原物质。

5) 观察 MH-110 培养过程中糖原的变化结果(见图 8)可知糖原的变化与多糖变化的趋势相吻合。40h 的培养葡萄糖最高可达 4.5g/L.

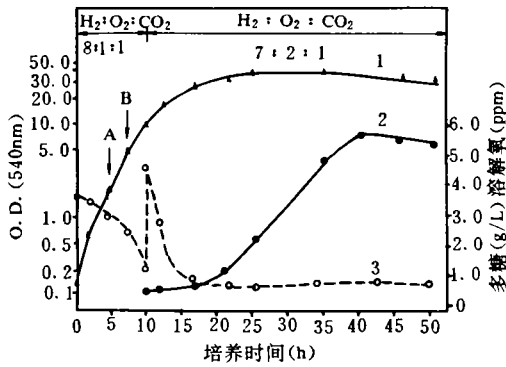


图 6 MH-110 培养过程中 Fe^{2+} 添加与菌体生长与多糖含量变化

箭头 A 处, 添加 0.2g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$
箭头 B 处, 添加 2.0g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$
1 表示 O.D 值 2 表示多糖含量
3 表示溶解氧

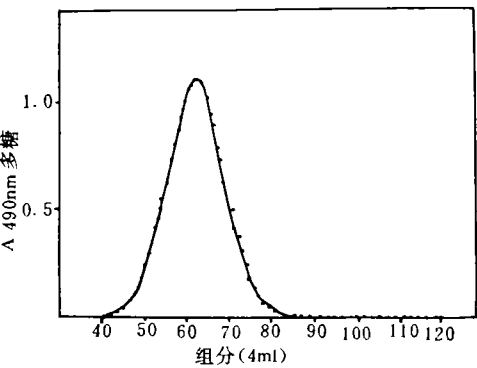


图 7 多糖物质在 Sepharose CL-4B 凝胶柱上洗脱图谱

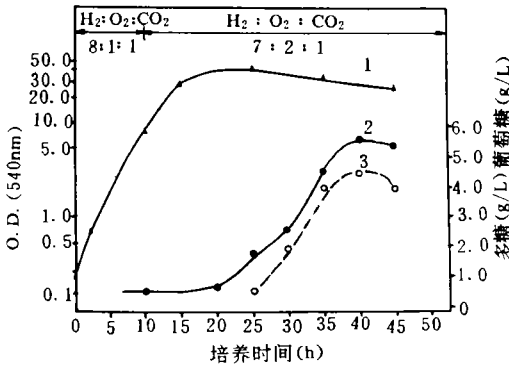


图 8 菌体生长与多糖、葡萄糖的形成

1 表示 O.D 值 2 表示多糖含量 3 表示溶解氧

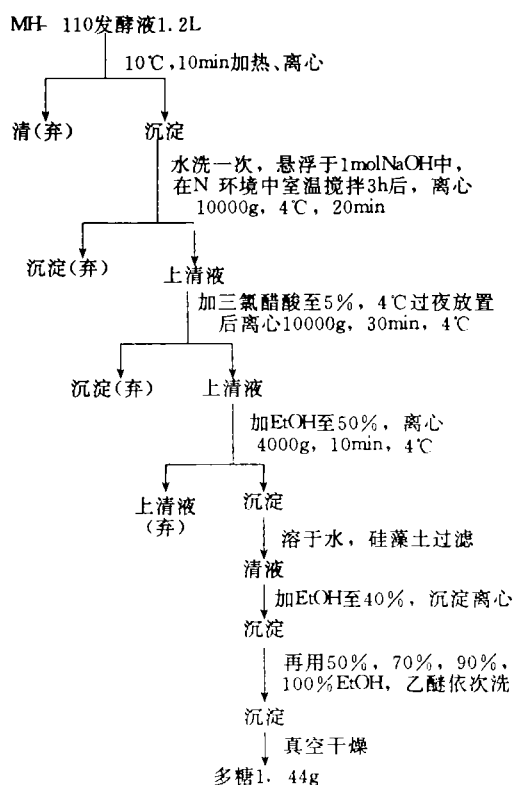
3 讨 论

1) 氧对 MH-110 生长是必须的,但在混合气体中的比例超过 40%,都不能生长,有些只能在 10%以下才能生长。因此氧的高、低对氢化细菌都是限制性因素。也是 MH-110 生长的一个重要因素, Mg²⁺ 被认为与产物代谢有着密切的关系。

2) MH-110 菌用来利用二氧化碳和产生多糖可能性分析 MH-110 菌是一株专性能自养菌。培养基的成分在海水中都是富含的。氧气和二氧化碳是空气的成分,混合气体中最主要的成分是氢气,而海洋中氢的过饱和现象是普遍存在的。海水中可以分离到它,也证实了这一点。进一步的工作是用海水为培养基来生产菌体和多糖的研究。

3) MH-110 是异养菌,它无法利用胞外的葡萄糖。如果在缺乏碳源——二氧化碳时,它能否利用胞内所积累的糖源或葡萄糖为碳源? 糖原在其体内是如何代谢的应进一步研究。

附图



Biomass Production From CO₂ by *Hydrogenovibrio marinus*

Xu Yan

(Wuxi University of Light Industry, China)

Masabaru Ishii Yasuo Igarashi Tohru Kodama

(The University of Tokyo Japan)

Abstract *Hydrogenovibrio marinus* MH-110 is an obligately chemolithoautotrophic and aerobic hydrogen-oxidizing bacterium. High cell-density cultivation of the marine bacterium was conducted. Under this culture condition, cell density reached 18.84g/L. In the meantime, the generation of a kind of polysaccharide, which can be accumulated in vitro up to 30.26% of cell dry weight, was observed. The polysaccharide was isolated, purified and identified as intracellular glycogen.

Subject-words Marine bacterium; Carbon dioxide; Polysaccharide