

黄原胶高产菌株 HL—9901发酵培养基的优化

胡德亮 陈有容 李柏林 齐凤兰 李淑侠 张雪花

(上海水产大学食品学院, 200090)

摘要 采用黄单胞杆菌(*Xanthomonas campestris*)诱变株 HL—9901进行试验。采用正交设计与统计学分析,确定出最佳发酵培养基配方为:淀粉4%,葡萄糖2%,蛋白胨0.1%, NaNO_3 1%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.3%, K_2HPO_4 0.3%, MgSO_4 0.1%, CaCO_3 0.09%。30h时补加1.5%的葡萄糖。最终产率可达到4.063g/100mL,碳源转化率为54.17%,发酵时间可缩短至54h。并测定了最优化培养基摇瓶发酵中相关控制参数的变化。

关键词 黄单胞杆菌,黄原胶,正交设计

中图分类号 TS201.3

黄原胶是由野生黄单胞菌以碳水化合物为主要底物,经发酵产生的一种酸性胞外杂多糖[赵大健和王锐 1986]。由于其具有诸多优良的性能[郑宝东等 1993],因此近年来在食品、化工、陶瓷、石油等许多行业中得到了越来越广泛的应用[梁凤来 1990,何敬欣等 1990]。而且目前国内许多厂家正在扩大生产。但相对来说,国内的产率多维持在3%~4%,周期多为72h~96h[王福源等 1998]。本文采用正交试验设计和数理统计的方法,进行了发酵培养基的优化,使黄原胶的产率达到了4.063g/100mL,发酵周期缩短至54h。

1 材料与方 法

1.1 试验菌种

HL—9901菌株。由本研究室自野油菜黄单胞杆菌诱变获得。

1.2 培养基

1.2.1 斜面菌种培养基(% ,W/V)(pH=7.0)

蔗糖 2 蛋白胨 1 酵母膏 0.5 牛肉浸膏 0.1 琼脂 2

1.2.2 液体菌种培养基(% ,W/V)(pH=7.0)

蔗糖 3 蛋白胨 1 NaNO_3 1 酵母膏 1 MgSO_4 0.05

菌种培养采用250mL三角瓶,装液量50mL,八层纱布封口,121℃灭菌20min。

1.2.3 摇瓶发酵培养基(pH=7.0)

碳源: 葡萄糖、可溶性淀粉

氮源: 蛋白胨、 NaNO_3

无机盐: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、 K_2HPO_4 、 MgSO_4 、 CaCO_3

有机酸: 柠檬酸

分别以上述九种成分作为发酵培养基的九个因素, 每个因素选取三个水平, 用 $L_{27}(3^{13})$ 正交表[韩於龔 1989]设计得到27种组合培养基。发酵培养基采用250mL 三角瓶, 装液量50mL, 八层纱布封口, 121℃灭菌20min。

1.3 试验条件

1.3.1 斜面菌种

28~29℃, 恒温培养箱培养72h。

1.3.2 种子培养液

$\Phi 1\text{mm}$ 的接种环取5环斜面菌种于液体培养基中, 28~29℃, 230rpm 摇床培养28h, 镜检菌体形态正常且无杂菌后备用。

1.3.3 摇瓶发酵

按正交设计的发酵液配方配制各组发酵液, 然后按10%的接种量接种种子培养液, 接着置于28~29℃, 230rpm 摇床培养72h。培养结束后用醇法沉降, 离心分离后将沉淀物在50℃烘至恒重, 每个产胶率结果均为三个平行样品的平均值。

1.3.4 O·D₆₅₀值测定条件

发酵过程中, 每隔4h 取一次样, 直至40h 时止。以未接种的种子液作空白对照, 采用721分光光度计, 在波长650nm 处测定 O·D 值。

1.3.5 其它参数的测定

pH 值的测定采用 YXQ·SG41·280型酸度计; 粘度的测定采用 NDJ-1型旋转粘度计, 4" 转子, 6rpm; 残糖的测定采用半定量尿糖试纸; 氨基氮的测定采用甲醛滴定法[何照范和张迪清 1999]。

2 结果

2.1 菌株 HL-9901 生长曲线的绘制

从图1中可见, 当培养时间达到28h 左右时, 菌种生长基本处于对数期与稳定期的交界处。而在约12~28h 这段对数期内, 菌体每分裂一次所需的代时(增代时间)最短, 即菌体的数量达到了最多, 代谢能力最为旺盛, 酶系最为活跃, 而此后则趋于平衡。考虑到实际生产的要求, 应尽量缩短菌种培养时间, 使单批发酵时间缩短。基于上述原则, 将液体菌种培养时间确定为28h。

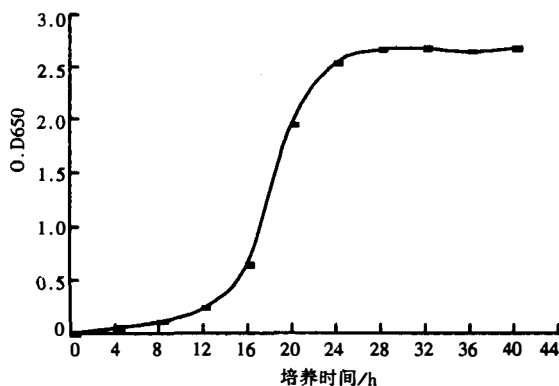


图1 HL-9901 菌株生长曲线

Fig. 1 The growth curve of strain HL-9901

2.2 最佳发酵培养基的确定

2.2.1 正交试验表头设计

以可溶性淀粉、葡萄糖、蛋白胨、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、 K_2HPO_4 、 MgSO_4 、 CaCO_3 、柠檬酸作为发酵因素,每个因素各选取三个水平,并按 $L_{27}(3^{13})$ 正交表设计27组摇瓶发酵试验,每组做3个平行。以下为表头设计。

表1 正交试验表头设计

Tab. 1 Table head design of the orthogonal trial

表头设计	A	B	C	D	E	F	G	H	I				
列号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
A 可溶性淀粉	A ₁ 3					A ₂ 4					A ₃ 5		
B 葡萄糖	B ₁ 2					B ₂ 1					B ₃ 0		
C 蛋白胨	C ₁ 0.3					C ₂ 0.2					C ₃ 0.1		
D NaNO_3	D ₁ 0.1					D ₂ 0.2					D ₃ 0.3		
E $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	E ₁ 0.1					E ₂ 0.3					E ₃ 0.5		
F K_2HPO_4	F ₁ 0.2					F ₂ 0.3					F ₃ 0.4		
G MgSO_4	G ₁ 0.5					G ₂ 0.3					G ₃ 0.1		
H CaCO_3	H ₁ 0.1					H ₂ 0.09					H ₃ 0.069		
I 柠檬酸	I ₁ 0					I ₂ 0.1					I ₃ 0.2		

注:30h 时补加浓度为1.5%的葡萄糖溶液。列号的“1”、“6”、“11”三栏中的数字均为“%”。

表2 正交表 $L_{27}(3^{13})$

Tab. 2 Orthogonal table $L_{27}(3^{13})$

试验序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
A	A ₁	A ₁	A ₁	A ₁	A ₁	A ₁	A ₁	A ₁	A ₁	A ₂	A ₂	A ₂	A ₂
B	B ₁	B ₁	B ₁	B ₂	B ₂	B ₂	B ₃	B ₃	B ₃	B ₁	B ₁	B ₁	B ₂
C	C ₁	C ₁	C ₁	C ₂	C ₂	C ₂	C ₃	C ₃	C ₃	C ₃	C ₃	C ₃	C ₁
D	D ₁	D ₂	D ₃	D ₁	D ₂	D ₃	D ₁	D ₂	D ₃	D ₁	D ₂	D ₃	D ₁
E	E ₁	E ₂	E ₃	E ₁	E ₂	E ₃	E ₁	E ₂	E ₃	E ₂	E ₃	E ₁	E ₂
F	F ₁	F ₂	F ₃	F ₁	F ₂	F ₃	F ₁	F ₂	F ₃	F ₃	F ₁	F ₂	F ₃
G	G ₁	G ₂	G ₃	G ₂	G ₃	G ₁	G ₃	G ₁	G ₂	G ₁	G ₂	G ₃	G ₂
H	H ₁	H ₂	H ₃	H ₂	H ₃	H ₁	H ₃	H ₁	H ₂	H ₂	H ₃	H ₁	H ₃
I	I ₁	I ₂	I ₃	I ₃	I ₁	I ₂	I ₂	I ₃	I ₁	I ₁	I ₂	I ₃	I ₃

14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
A ₂	A ₂	A ₂	A ₂	A ₂	A ₃	A ₃	A ₃	A ₃	A ₃	A ₃	A ₃	A ₃	A ₃
B ₂	B ₂	B ₃	B ₃	B ₃	B ₁	B ₁	B ₁	B ₂	B ₂	B ₂	B ₃	B ₃	B ₃
C	C ₁	C ₂	C ₂	C ₂	C ₂	C ₂	C ₂	C ₃	C ₃	C ₃	C ₁	C ₁	C ₁
D ₂	D ₃	D ₁	D ₂	D ₃	D ₁	D ₂	D ₃	D ₁	D ₂	D ₃	D ₁	D ₂	D ₃
E ₃	E ₁	E ₂	E ₃	E ₁	E ₃	E ₁	E ₂	E ₃	E ₁	E ₂	E ₃	E ₁	E ₂
F	F ₂	F ₃	F ₁	F ₂	F ₂	F ₃	F ₁	F ₂	F ₃	F ₁	F ₂	F ₃	F ₁
G ₃	G ₁	G ₃	G ₁	G ₂	G ₁	G ₂	G ₃	G ₂	G ₃	G ₁	G ₃	G ₁	G ₂
H ₁	H ₂	H ₁	H ₂	H ₃	H ₃	H ₁	H ₂	H ₁	H ₂	H ₃	H ₂	H ₃	H ₁
I ₁	I ₂	I ₂	I ₃	I ₁	I ₁	I ₂	I ₃	I ₃	I ₁	I ₂	I ₂	I ₃	I ₁

由表3可以发现,该正交组合中的最大产胶率为3.996g/100mL,最小产胶率为1.700g/100mL。

表3 各组摇瓶试验的产胶率

Tab. 3 Xanthan gum productivlty of each group shake flask trial

试验序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
产胶率	3.391	3.323	2.215	2.301	3.179	2.616	1.700	2.334	3.526
试验序号	10	11	12	13	14	15	16	17	18
产胶率	3.912	3.371	3.600	3.475	3.396	3.301	3.845	2.832	2.947
试验序号	19	20	21	22	23	24	25	26	27
产胶率	3.996	2.794	3.785	3.114	3.412	3.374	3.711	2.035	3.000
T	84.485								
T ² /27	264.360								

2.2.2 试验结果分析

各组摇瓶试验的平均产胶率结果见表3。各组产胶率结果分析见表4。试验结果方差分析见表5。根据表4的统计分析,黄原胶发酵培养基的最佳配方应为:A₂B₁C₃D₁E₂F₂G₃H₂I₁。但该组合在表1的正交表中并未出现。所以,上述的培养基组合是否为该正交试验中的最优化培养基,需要在试验中加以验证。

由表5可知。因子A高度显著,因子E和I显著,其余因子不显著。该结果虽然说明碳源在黄原胶的合成中起关键作用,但并非碳源含量越高对黄原胶的合成越有利。因为任何生物的生长都有一个最适环境,而某种成分的改变,必然会影响这种最适条件。碳源的含量过高,同样会对菌体产生底物抑制,不利于胶体的合成。在多次摇瓶试验中发现,如果继续提高总碳源含量,发酵至终点时,试验组的残糖含量大于2%。而通过发酵罐试验发现当所加总碳源量为7.5%

表4 产胶率结果统计分析表

Tab. 4 Statistic analysis table of Xanthan Gum productivlty

	A	B	C	D	E
I _j	24.585	30.387	28.483	27.847	29.445
II _j	30.679	28.168	27.725	28.295	26.676
III _j	29.221	25.930	28.307	28.343	28.364
I _j ²	604.422	923.370	811.281	775.455	867.008
II _j ²	941.201	793.436	768.676	800.607	711.609
III _j ²	853.867	672.365	801.286	803.326	804.516
(I _j ² +II _j ² +III _j ²)/9	266.610	265.463	264.583	264.376	264.793
(I _j ² +II _j ² +III _j ²)/9-T ² /27	2.250	1.103	0.223	0.016	0.433
	F	G	H	I	
	27.150	27.791	28.090	29.042	30.759
	29.505	27.851	30.103	29.396	28.035
	27.830	28.843	26.292	26.047	25.691
	737.123	772.340	789.048	843.438	946.116
	870.545	775.678	906.191	864.125	785.961
	774.509	831.919	691.269	678.446	660.027
	264.686	264.437	265.168	265.112	265.789
	0.326	0.007	0.808	0.752	1.429
					0.543
					0.372

表5 试验结果方差分析表

Tab. 5 Matrix analysis table of the test results

方差来源	偏差平方和	自由度	平均偏差平方和	F	显著性
A	$S_A = S_1 = 2.250$	2	1.125	6.818	* ₁
B	$S_B = S_2 = 1.103$	2	0.552	3.345	
C	$S_C = S_3 = 0.016$	2	0.008		
D	$S_D = S_4 = 0.433$	2	0.217	1.315	
E	$S_E = S_5 = 1.314$	2	0.657	3.982	* ₂
F [△]	$S_F = S_7 = 0.326$	2	0.163		
G [△]	$S_G = S_8 = 0.077$	2	0.039		
H	$S_H = S_9 = 0.808$	2	0.404	2.448	
I	$S_I = S_{11} = 1.429$	2	0.715	4.333	* ₂
误差	$S_{\text{误}} = S_3 + S_{10} + S_{12} + S_{13} = 1.890$	8	0.236		
误差 [△]	$S_{\text{误}} = S_{\text{误}} + S_4 + S_7 + S_8 = 2.309$	14	0.165		

注: (1) $F_{0.05}(2, 14) = 3.74$, $F_{0.01}(2, 14) = 6.51$; (2) *₁ 表示该因素极显著; *₂ 表示该因素显著。

时,保持充足的通气量和适当的搅拌转速,最后的残糖含量可维持在0.5%左右。说明搅拌不仅使培养基成分均匀分布,而更主要的是增大了溶氧量。因此可以说通气量在黄原胶的生物合成中起着关键性作用。这一点与 Flores 等[1994]和 Herbst 等[1992]的试验结果相符合。

2.3 最佳发酵培养基的确定及其相关参数的测定

将由表4筛选出的最佳发酵培养基配方 $A_2B_1C_3D_1E_2F_2G_3H_2I_1$ 按正交筛选试验中的条件进行摇瓶发酵试验。同时,在发酵过程中,每隔6h取一次样品,测定其pH值、粘度(4"转子, 6rpm)、残糖、氨态氮含量,并测定发酵结束后的产胶率。

2.3.1 发酵过程中的粘度变化情况

从图2可见,在18h~48h之间,黄原胶发酵液的粘度呈上升趋势,从48h后基本趋于平稳。因为黄原胶是一种典型的假塑性流体,其溶液粘度随剪切速率的增加会明显降低,而黄单胞杆菌是一种需氧菌,所以当发酵进行至18h后,可适当增加搅拌转速,以增加剪切速率,降低粘度,从而有利于通入的空气与发酵液充分接触,增大溶氧量,以利于菌体合成黄原胶。

2.3.2 发酵过程中氨基氮的变化趋势

图3的变化曲线显示,开始的6h内,菌体的生长和底物中氮源的消耗呈现此消彼长的变化关系,但以菌体生长占优势。6h~30h内,氨基氮变化基本趋于平稳,即底物中蛋白质的消耗、菌体的生长和酶类的产生基本保持平衡。从30h~48h,氨基氮则呈现下降趋势,结合图2中发酵液粘度的变化情况以及图1的菌体生长曲线,说明此段时期以消耗酶类合成黄原胶为主,同时菌体也在逐渐死亡。而从48h至发酵结束,氨基氮含量的变化较小。

2.3.3 摇瓶发酵过程中残糖随时间的变化曲线

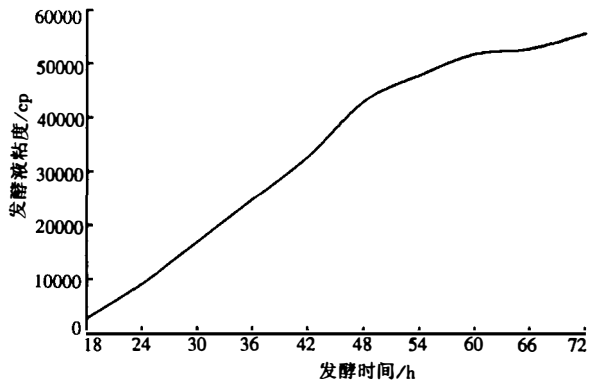


图2 发酵液粘度与发酵时间关系

Fig. 2 Relationship between the viscosity of broth and the fermentation time

由图4可见,从54h左右开始至发酵结束,发酵液中的残糖含量变化较小。

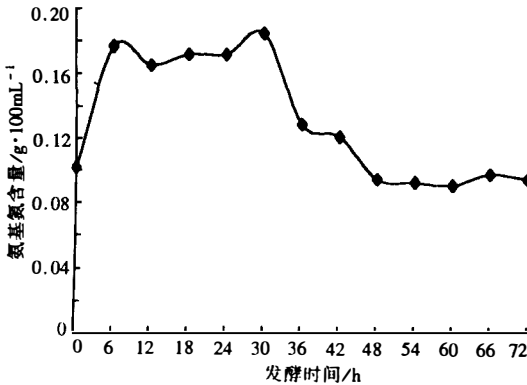


图3 发酵过程中氨基酸氮的变化

Fig. 3 Variation of amino acid nitrogen during fermentation

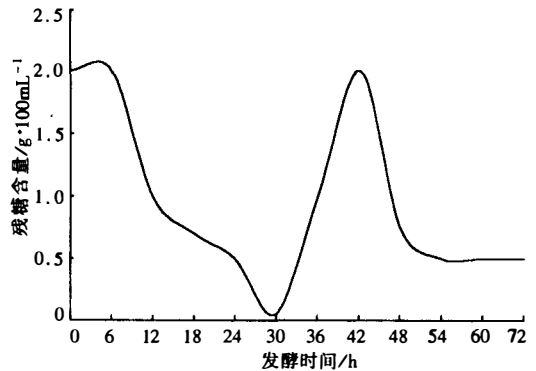


图4 残糖含量与发酵时间的关系

Fig. 4 Relationship between remnant sugar and fermentation time

2.3.4 发酵过程中产胶率的变化曲线

从图5中可以看出,发酵过程中的产胶率逐渐增大,直至54h起,产胶率才开始基本保持稳定。同时分别根据图2、图3和图4的发酵液粘度、氨基酸含量变化和残糖变化曲线,对比54h与72h的产胶率差异以及这段时间所需要的能源,最终将 HL-9901 菌株的发酵时间确定为 54h。

2.3.5 优化培养基的产胶率

由表4筛选出的最佳发酵培养基配方 A₂B₁C₃D₁E₂F₂G₃H₂I₁ 的产胶率在单独的验证试验中可以达到 4.063g/100mL,且基本保持稳定,碳源转化率为 54.173%,高于正交表2中所列的各组试验中的最高产胶率 3.996g/100mL。由于正交试验法安排的试验方案具有一定的代表性,能够比较全面地反应各因子各水平对最终指标影响的大致情况,并且可以大大减少试验的次数,而且能够推断出在可供选择的因子水平范围内的最佳工艺条件,因此在培养基的优化中广为应用。

此外在实验中发现,继续提高总碳源的比例,产胶率的提高幅度较小,而发酵液中残糖剩余量大于2%,从节约的原则出发,不适于继续增大碳源的比例,而以7.5%较为合适。

3 结论

通过上述试验,确定出黄原胶高产菌株 HL-9901 的最优化培养基为:淀粉4%,葡萄糖

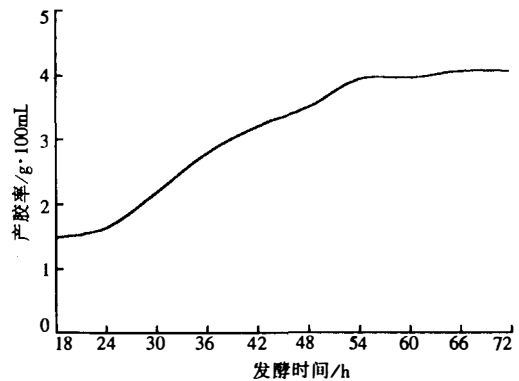


图5 产胶率与发酵时间的关系

Fig. 5 Relationship between productivity and fermentation time

2%, 蛋白胨 0.1%, NaNO_3 1%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.3%, K_2HPO_4 0.3%, MgSO_4 0.1%, CaCO_3 0.09%。30h 时补加浓度为 1.5% 的葡萄糖溶液。

由于本试验所采用的数据主要来自摇瓶试验, 而发酵罐生产和摇瓶发酵会有一些的差距。所以, 后续的试验仍然有以下几个问题需要解决: ①发酵罐生产中的最佳转速和最适通气量以及溶氧量; ②发酵过程中的胞内和胞外酶种类的变化趋势; ③摇瓶发酵试验中的残糖变化曲线及产胶率的变化曲线显示, 在 54h 左右至 72h 之间, 一些表观参数基本保持恒定, 但胶体性能是否还会发生较大变化。

参 考 文 献

- 王福源, 陈振风, 王锦华. 1998. 现代食品发酵技术. 北京: 中国轻工业出版社, 618~627
- 何敬欣, 郭金岭, 姚保知. 1990. 食品添加剂—汉生胶的特征和应用. 安徽化工, 3: 53~55
- 何照范, 张迪清. 1999. 保健食品化学及其检测技术. 北京: 中国轻工业出版社. 140~141
- 郑宝东, 陆则桥, 陈丽娇. 1993. 黄原胶流变特性的应用. 福建农学院学报, 22(4): 494~497
- 赵大健, 王 锐. 1986. 黄原胶及其在食品工业上的应用. 食品与发酵工业, 69(3): 48~54
- 梁凤来. 1990. 黄原胶的性能及其在食品中的应用. 食品科学, 9: 34~39
- 韩於龔. 1989. 应用数理统计. 北京: 北京航空航天大学出版社, 237~273, 412~424
- Flores F, Torres L G, Galindo E. 1994. Effect of the dissolved oxygen tension during cultivation of *X. campestris* on the production and quality of xanthan gum. J Biotechnol, 34(2): 165~173
- Herbst Holger, Schumpe Adrian, Deckwer Wolf Dieter. 1992. Xanthan production in stirred-tank fermentors, oxygen transfer and scale-up. Chem Eng Technol, 156(6): 425~434

OPTIMIZATION OF FERMENTATION CULTURE MEDIUM FOR HIGH YIELD STRAIN HL-9901 OF XANTHAN GUM

HU De-Liang, CHEN You-Rong, LI Bai-Lin, QI Feng-Lan,
LI Shu-Xia, ZHANG Xue-Hua
(College of Food Science, SFU, 200090)

ABSTRACT The strain of HL-9901 induced from *Xanthomonas campestris* was used in the experiment. with orthogonal design and statistical analysis, the optimal prescription for fermentation was composed of 4% starch, 2% glucose, 0.1% peptone, 0.1% NaNO_3 , 0.3% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0.3% K_2HPO_4 , 0.1% MgSO_4 , and 0.09% CaCO_3 , and 1.5% glucose was supplemented after 30 hours fermentation. The final productivity of xanthan gum was 4.063 g/100mL, the transformation of carbon source was 54.17% and the time of fermentation could be shortened to 54 hours. Meantime, some relevant parameters were measured in the course of fermentation with the optimized culture.

KEYWORDS *Xanthomonas campestris*, Xanthan gum, orthogonal design