

文章编号:1671-6833(2003)01-0051-03

野油菜黄单孢菌的诱变育种及发酵培养基的确定

常 春, 马晓建, 王 娟, 方书起, 李洪亮

(郑州大学化工学院, 河南 郑州 450002)

摘 要: 利用紫外线和氯化锂对野油菜黄单孢菌进行诱变, 从诱变菌株中筛选出了 1 株具有较高粘度和产胶率的菌株 ZG-1. 同时, 利用此菌株通过正交试验, 确定了发酵培养基配方: 淀粉 2%, 蔗糖 2%, 蛋白胨 0.3%, 豆饼粉 0.2%, CaCO_3 0.3%, 柠檬酸 0.1%. 试验结果表明: 菌株的最终发酵液粘度和产胶率由初始的 4.5 Pa·s 和 1.99% 提高到 12.28 Pa·s 和 3.45%.

关键词: 黄原胶; 野油菜黄单孢菌; 诱变

中图分类号: Q 93.331 **文献标识码:** A

0 引言

黄原胶是以野油菜黄单孢菌(*Xanthomonas campestris*) 为菌种, 以碳水化合物为主要原料发酵产生的一种高粘度水溶性胞外多糖. 因黄原胶具有许多优良的性质, 它被广泛地应用于食品、石油、化妆品、纺织印染、农药、医药、造纸等几十个领域. 它可作为乳化剂、稳定剂、粘合剂、胶化剂、偶联剂、润滑剂、膜形成剂、增稠剂和悬浮剂等^[1]. 目前, 黄原胶已经成为产量最大的一种微生物多糖. 我国也对黄原胶的需求不断增加, 对黄原胶的研究与开发也在不断地深入. 野油菜黄单孢菌是工业生产黄原胶的菌种, 为了提高菌种的能力, 可以通过菌种诱变的方法来进行改良. 本文通过紫外线和 LiCl 相结合, 对野油菜黄单孢菌进行了诱变, 以期提高菌种的性能.

1 试验材料与方法

1.1 出发菌种

野油菜黄单孢菌, 由本实验室分离.

1.2 培养基^[2]

斜面培养基: 蔗糖 1.5%, 蛋白胨 0.6%, 牛肉膏 0.3%, NaCl 10.5%, 琼脂 2%, pH 值为 7.0.

种子培养基: 同斜面培养基, 不加琼脂.

LiCl 培养基: 同斜面培养基, 另加入 0.35% 的 LiCl.

发酵培养基: 淀粉 4.0%, 蛋白胨 0.6%, Ca-

CO_3 0.35%, pH 7.0.

上述培养基均在 121 °C 温度下, 灭菌 30 min.

1.3 诱变及分离

菌种原始斜面活化后, 接种于到 5 mL 种子培养基中, 28 °C 培养 16 h, 10000 r/min 离心分离 5 min, 将分离后的菌体用无菌蒸馏水洗涤 1 次, 制成 10^8 个/mL 的菌悬浮液. 吸取 2 mL 菌悬液加入 $\Phi 5$ cm 的培养皿中, 在磁力搅拌下, 置于 15 W 紫外灯下, 距离 30 cm, 照射时间 30~35 s^[3]. 照射后的菌悬液, 涂布于 0.35% 的 LiCl 的培养基中, 避光于 28 °C 下培养. 整个操作均在红光下进行^[4]. 培养成熟后, 挑取平板上的单菌落, 接种于斜面培养基上, 同时进行摇瓶发酵测定.

1.4 测定方法

产胶率的测定: 称取适量发酵液, 加入发酵液 2 倍体积的酒精, 室温下搅拌 3 min, 然后过滤掉酒精, 再加入 1 倍体积的酒精搅拌过滤, 得到的黄原胶置于烘箱中, 60 °C 烘干至恒重, 精密天平称量. 产胶率(%) = 黄原胶干重(g) / 发酵液质量(g) $\times 100\%$.

粘度的测定: 使用 NDJ-1 型粘度计测量粘度.

2 试验结果与讨论

2.1 菌落直径大小与粘度和产胶率关系

有文献报道, 直径大的菌落产胶较好^[5]. 为了考察菌落直径与粘度和产胶率的关系, 选取 50 个菌落进行了发酵测定. 测量数据如表 1 所示.

收稿日期: 2002-11-06; 修订日期: 2002-12-23

作者简介: 常 春(1973-), 男, 河南省郑州市人, 郑州大学工程师, 硕士, 主要从事生化设备及工艺的研究.

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

表 1 菌落直径与粘度和产胶率的关系

Tab .1 Relation between diameter of strain and viscosity and gum yield

序号	直径/ mm	粘度/ (Pa s)	产胶率/ %	序号	直径/ mm	粘度/ (Pa s)	产胶率/ %	序号	直径/ mm	粘度/ (Pa s)	产胶率/ %
1	9.0	5.64	2.00	18	12.0	6.65	2.11	35	15.0	5.34	1.56
2	12.5	5.91	2.04	19	12.0	5.94	1.88	36	13.5	5.87	2.23
3	9.0	5.92	1.99	20	12.0	5.86	1.89	37	14.0	4.84	1.83
4	11.6	5.43	1.87	21	11.5	3.42	1.26	38	13.5	5.31	1.98
5	11.5	5.63	2.21	22	12.0	6.15	1.85	39	13.0	6.32	3.08
6	11.0	5.76	1.90	23	8.0	6.21	1.92	40	12.5	4.61	1.59
7	12.5	5.02	1.90	24	11.5	5.31	1.78	41	11.5	4.98	1.63
8	10.5	5.15	1.86	25	9.0	4.94	1.69	42	10.0	5.51	1.96
9	11.0	5.07	1.79	26	11.0	6.32	2.73	43	9.0	5.16	1.85
10	11.5	5.43	1.83	27	10.5	5.63	1.98	44	13.0	4.73	1.49
11	11.5	4.59	1.66	28	12.0	5.18	1.65	45	10.5	5.90	2.03
12	11.5	5.65	1.77	29	10.0	5.21	1.74	46	15.0	7.35	2.21
13	12.5	5.14	1.56	30	10.5	5.61	1.75	47	11.5	6.89	2.23
14	13.5	6.12	2.01	31	17.0	5.58	1.85	48	14.0	4.36	3.42
15	11.0	5.27	1.86	32	11.5	5.23	1.64	49	10.5	6.13	2.05
16	13.5	5.25	1.75	33	14.0	5.67	1.73	50	10.5	6.05	2.10
17	12.5	5.22	1.63	34	13.5	6.14	2.33	51	9.0	4.50	1.99

说明:51 号为原始菌种.

从表 1 的数据可以看到,直径的大小与产胶的性能并不一一对应,直径大,并不表明产胶好;直径小的,也不能说明产胶能力差.如序号 31 号,直径为 17.0 mm,发酵液粘度为 5.58Pa s,产胶率为 1.85%;而序号 23 号,直径为 8.0 mm,发酵液粘度为 6.21Pa s,产胶率为 1.92%.由此,可以得出结论:直径的大小不能对菌落的筛选起决定作用,只能起到参考作用.

2.2 高性能菌株的选育

本实验采用紫外线和氯化锂混合诱变,挑取 50 株菌落进行初筛和复筛.得到一株产胶粘度和产胶率较高的菌株,命名为 ZG-1.经过连续 10 代斜面接种,发酵试验表明该菌株性能稳定,结果见表 2.

表 2 菌种的稳定性试验数据

Tab .2 Data of stability of strain

代数	粘度/(Pa s)	产胶率/%
1	8.24	3.14
2	8.25	3.15
3	8.12	3.05
4	8.13	3.05
5	8.20	3.14
6	8.26	3.16
7	8.15	3.12
8	8.23	3.16
9	8.20	3.08
10	8.23	3.15

2.3 发酵培养基的确定

利用获得的菌株,采用正交实验对发酵培养基进行了优化^[9].分别从碳源、氮源、无机盐、有机酸四个因素进行实验设计,见表 3.

表 3 正交设计因素和水平

Tab .3 Factor and level of orthogonal design

水平	碳源	氮源	无机盐	有机酸/%
1	淀粉 4%	蛋白胨 0.5%	CaCO ₃ 0.3%	0.0
2	蔗糖 4%	蛋白胨 0.3%	KH ₂ PO ₄ 0.5%	0.05
		豆饼粉 0.2%	MgSO ₄ 0.02%	
3	蔗糖 2%	蛋白胨 0.2%	CaCO ₃ 0.2%	
	淀粉 2%	豆饼粉 0.3%	KH ₂ PO ₄ 0.5%	0.1
			MgSO ₄ 0.02%	

分别以发酵液粘度和产胶率为试验结果进行了L₉(3⁴)正交实验.结果见表 4 和表 5.

通过极差分析,可以看到发酵培养基各因素影响的大小为:无机盐>氮源>有机酸>碳源.从中确定的最佳配方为:蔗糖 4%,蛋白胨 0.3%,豆饼粉 0.2%,CaCO₃0.3%,柠檬酸 0.1%.

同样经极差分析,各因素对产胶的影响顺序为:无机盐>氮源>碳源>有机酸.最佳配方为:淀粉 2%,蔗糖 2%,蛋白胨 0.3%,豆饼粉 0.2%,CaCO₃0.3%,柠檬酸 0.1%.

表 4 发酵液粘度的试验结果

Tab .4 Data of viscosity of fermentation fluid

试验号	碳源	氮源	无机盐	柠檬酸	粘度/(Pa·s)
1	1	1	1	1	7.33
2	1	2	2	2	1.14
3	1	3	3	3	5.40
4	2	1	2	3	5.66
5	2	2	3	1	6.08
6	2	3	1	2	10.96
7	3	3	2	1	0.39
8	3	1	3	2	2.07
9	3	2	1	3	12.21
M_j	13.87	9.97	30.51	13.80	
$M_{\bar{j}}$	17.61	19.43	2.09	14.17	
$M_{\bar{\bar{j}}}$	14.67	16.75	13.55	18.18	
m_j	4.62	3.32	10.17	4.60	
$m_{\bar{j}}$	5.87	6.48	0.70	4.72	
$m_{\bar{\bar{j}}}$	4.89	5.58	4.52	6.06	
R_j	3.15	9.47	1.64		

说明:1,2,3(试验号除外) 分别对应表 4 中各因素相对应的水平; M_j 、 m_j 分别为第*j* 水平*j* 因子所有试验结果的总和和平均值; R_j 为*j* 因子对指标影响的显著性.

表 5 菌株产胶率的试验结果

Tab .5 Data of yield of xanthan gum

试验号	碳源	氮源	无机盐	柠檬酸	产胶率/%
1	1	1	1	1	2.56
2	1	2	2	2	1.14
3	1	3	3	3	2.18
4	2	1	2	3	0.5
5	2	2	3	1	2.81
6	2	3	1	2	3.28
7	3	3	2	1	0.3
8	3	1	3	2	1.71
9	3	2	1	3	3.44
M_j	5.88	4.77	9.28	5.67	
$M_{\bar{j}}$	6.59	7.39	1.94	6.13	
$M_{\bar{\bar{j}}}$	5.45	5.76	6.70	6.12	
m_j	1.96	1.59	3.09	1.89	
$m_{\bar{j}}$	2.20	2.46	0.65	2.04	
$m_{\bar{\bar{j}}}$	1.82	1.92	2.23	2.04	
R_j	0.38	0.87	2.44	0.15	

说明:1,2,3(试验号除外) 分别对应表 4 中各因素相对应的水平; M_j 、 m_j 分别为第*j* 水平*j* 因子所有试验结果的总和和平均值; R_j 为*j* 因子对指标影响的显著性.

比较两种结果,无机盐对发酵液的粘度和产胶率的影响最大,氮源其次,而有机酸的加入对发酵液粘度的增加要比产胶率增加的影响大,碳源总的的影响较小.

表 4 和表 5 的试验结果表明:试验号 6 和试验号 9 的结果比其他试验号的结果好,所以,为了

最终确定发酵的最适培养基,以试验号 6、9 和由两个正交实验确定的两个培养基配方共 4 组,再次进行重复摇瓶实验,来确定最终的组成,结果见表 6.

表 6 摇瓶试验结果

Tab .6 Data of fermentation in shake flask

项目	发酵液粘度/(Pa·s)	产胶率/%
试验 6	10.96	3.28
试验 9	12.21	3.44
表 4 正交试验	12.25	3.41
表 5 正交试验	12.28	3.45

经过以上试验,综合考虑产胶率和发酵液粘度的影响,确定以由产胶率正交试验表 5 得到的配方作为发酵培养基,即淀粉 2%、蔗糖 2%、蛋白胨 0.3%、豆饼粉 0.2%、CaCO₃0.3%、柠檬酸 0.1%.

3 结论

(1) 利用紫外线和LiG 复合诱变,得到一株高产菌株,经 10 代发酵试验表明:该菌株发酵性能保持稳定.

(2) 通过正交实验,分别考察了碳源、氮源、有机酸、无机盐等因素对发酵的影响,结果表明:各因素对发酵液粘度的影响大小为:无机盐>氮源>有机酸>碳源.而对产胶率的影响大小为:无机盐>氮源>碳源>有机酸.

(3) 通过进一步试验验证,得到了较佳的发酵培养基配方:淀粉 2%,蔗糖 2%,蛋白胨 0.3%,豆饼粉 0.2%,CaCO₃0.3%,柠檬酸 0.1%.

参考文献:

[1] 陈焕章.黄原胶的生产与应用[J].化学工业与工程,1996,13(2):61~62.

[2] 常 春,徐桂转,李洪亮,等.黄原胶 QH₇₉ 菌种的发酵工艺的研究[J].郑州工业大学学报,2000,21(1):92~95.

[3] 黄筱萍,刘 兰.野油菜黄单孢菌 X·C-18 的选育及发酵条件的研究[J].江西科技,1997,15(1):14~17.

[4] 杜连祥.工业微生物学实验技术[M].天津:天津科学技术出版社,1992.

[5] 俞 峰,姚 恕,陈 岚,等.黄原胶产生菌 Xanthomonas campestris 027 的诱变和选育[J].工业微生物,1993,23(5):24~27.

[6] 全国化工系统高校教学协作组编.概率统计[M].郑州:河南科学技术出版社,1991.

1995.783~786.

[4] 徐亚同. 废水生物处理的运行和管理 [M] . 上海: 华东师范大学出版社, 1989.

[5] 徐亚同. 废水中氮磷的处理 [M] . 上海: 华东师范大学出版社, 1994.

[6] 张继华. 化学沉淀法处理磷化废水 [J] . 工业水处理, 2000.

[7] 曹忠云, 王珍云. 无机化学反应方程式手册 [M] . 湖南: 湖南科学技术出版社, 1982. 474.

[8] 万亚珍, 刘金盾, 方文骥, 等. 用复合沉淀剂从废水中除磷的理论计算 [J] . 无机盐工业, 2000, 32(3) : 9~11.

[9] 万亚珍, 刘金盾, 方文骥, 等. 工业废水除磷研究 [J] . 化工矿物与加工, 2002, 31(8) : 19~24.

First Treat ments with Phosphorus in Wastewater method of Chemical Precipitation

WAN Ya -zhen , ZHANG Hao -qin , LIU Jin -dun , FAN Guo -dong
(College of Chemical Engineering , Zhengzhou University , Zhengzhou 450002, China)

Abstract : In the paper , the wastewater is used as research system and some data are obtained in this process . The result shows this process keeps the characteristics of chemical precipitation , such as : wider range , higher removing rate and simpler operating conditions . Precipitant $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$ has big crystal and is easily filtered from system . The optimal condition in this process is : original pH is 9.4, $[NH_4^{+}] / [P] = 1$, $[Mg^{2+}] / [P] = 1.3$ (on mle) .

Key words : phosphorus removal ; compound precipitants ; chemical precipitation

(上接第 53 页)

Mutation of Xanthomonas Campestric and Definition of Medium

CHANG Chun , MA Xiao -jian , WANG Juan , FANG Shu -qi , LI Hong -liang
(College of Chemical Engineering , Zhengzhou University , Zhengzhou 450002, China)

Abstract : Xanthomonas compestris is induced by UV and LiCl in the study , and a strain , named ZG⁻¹, which can get high viscosity fluid and high yield of xanthan gum is obtained . Then an optimal medium is studied by orthogonal experiments . The last medium is starch 2% , sugar 2% , peptone 0.3% , bean powder 0.2% , $CaCO_3$ 0.3% , citric acid 0.1% . The result shows that the initial viscosity and gum yield increase from 4.53Pa s and 1.99% to 12.28Pa s and 3.45% respectively .

Key words : xanthan gum ; Xanthomonas compestris ; mutation