

# 混合烷烃对野油菜黄单胞菌合成黄原胶的影响

欧 杰, 李柏林, 程抒劫  
(上海水产大学食品学院, 上海 200090)

**摘 要:** 本实验研究野油菜黄单胞菌以玉米淀粉作为碳源进行黄原胶生物合成过程中, 添加作为携氧剂的混合烷烃对提高产胶率的影响, 同时电镜观察不同发酵时期野油菜黄单胞菌的产胶情况。在摇瓶发酵的基础上, 进行发酵罐实验。添加 8% 混合烷烃发酵 66h 后, 黄原胶产胶率和碳源转化率明显提高。结果显示: 摇瓶发酵产胶率可达 3.84%(对照组为 2.58%), 碳源转化率为 76.8%(对照组为 51.6%); 发酵罐产胶率可达 4.18%(对照组为 2.90%), 碳源转化率为 83.6%(对照组为 58.0%)。

**关键词:** 黄原胶; 混合烷烃; 野油菜黄单胞菌

Effects of Oxygen-vectors (Alkane Mixture) on Xanthan Gum Biosynthesis  
in Cultures of *Xanthomonas campestris*

OU Jie, LI Bai-lin, CHENG Shu-jie  
(College of Food Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** Xanthan gum is categorized to be an exospore heteropolysaccharide in cultures of *Xanthomonas campestris* during fermentation in carbohydrates (corn starch) as main substrate. In order to improve xanthan gum productivity, the effects of adding oxygen-vectors (alkane mixture) on xanthan fermentation were studied. Also, the strains were observed at different fermentation time under transmission electron microscope (TEM). When cultivated for 66 h by addition of 8% alkane mixture, xanthan gum yield and transformation rate of carbon source were obviously increased. By means of the shaking flask testing the results were 3.84% and 76.8% for the gum productivity and transformation rate respectively (control, 2.58% and 51.6%, respectively), whereas in the fermentor testing those were 4.18% and 83.6% respectively (control, 2.90% and 58.0%, respectively).

**Key words** xanthan gum; alkane mixture; *X. campestris*

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)08-0273-04

黄原胶(xanthan gum)是野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas caperstris*)以碳水化合物为主要底物,在适宜条件下发酵产生的一种酸性胞外荚膜多糖。野生型黄单胞菌是好氧菌,因此,发酵过程中必须不断通氧。氧气的传质速率以及溶氧状况,不仅会影响黄原胶的产量和质量,还会影响其分子量的大小<sup>[1-2]</sup>。在培养过程中,随着发酵液黏度增大,发酵系统中的溶氧更低,致使黄原胶的产量难以提高。虽然提高搅拌转速能有效地提高溶氧传质速率,但由于高转速形成的高剪切力使菌体受损,温度升高,并降低细胞活性,从而影响产酶能力,导致产量降低。而单纯加大通气量,效果也欠佳<sup>[3]</sup>。为此,有必要探讨新的强化供氧途径。

Bailey等<sup>[4]</sup>从革兰氏阴性菌透明颤菌(*Vitreoscilla* sp.)中克隆编码血红蛋白类蛋白的基因,转入几种不同的重组菌。转入的细菌血红蛋白结合环境中的氧气,在细胞内创造更高水平的氧浓度,这样可以促进细胞的生长,显著地增加细胞对氧的吸收,并且增加产量。利用生物学方法无疑提供了一个聪明的解决途径,具有一定的方向性。

氧载体(携氧剂)一般指不溶于培养基但能够吸附或包裹、溶解氧的物质,通过在发酵液中引入一种新的液相(与发酵液互不相溶),以减少气液传氧阻力,从而提高氧气的传质速率,这种液相一般具有比水更高的溶氧能力(20℃时,氧在水中的溶解度为 8.4mg/L<sup>[4]</sup>,在正十二烷中为 54.9mg/L<sup>[3]</sup>)。可作为氧载体的液体有:烷烃、

收稿日期: 2007-05-29

基金项目: 上海市重点学科建设项目(T1102)

作者简介: 欧杰(1964-),男,副教授,硕士,研究方向为食品微生物学。

全氟化碳(perfluorocarbons, PFCs)等。烷烃可作为氧载体的作用,较早在石油发酵中发现,最近有人报道在产气气杆菌培养中,加入20%的烷烃(十一烷到十七烷混合物), $O_2$ 的传氧系数可提高4.6倍,从而提高菌体生长。在不改变搅拌通气条件,即不增加能量输入,加入正烷烃可增加溶氧系数。烷烃价格低廉,易于水相分离,可重复使用,不失为提高溶氧的好办法<sup>[5]</sup>。混合烷烃是石油工业副产物之一,应用于高产黄原胶的工业化大生产有着实际应用价值。

本研究试图确定最适的混合烷烃添加浓度,并且通过电镜观察不同发酵时期野油菜黄单胞菌的产胶情况,进一步印证其对黄原胶合成的促进作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

本实验室保藏野油菜黄单胞杆菌 *Xanthomonas campestris* 2HL。

### 1.2 试剂与原料

混合烷烃 中国石化金陵公司。

### 1.3 仪器与设备

HYG-III型回转式恒温调速摇瓶柜 上海医药工业研究所; JEM-100CX II 电镜 日本 JEOL 公司; FMG-5L (II)生物反应器 上海国强生化工程装备有限公司。

### 1.4 培养基

#### 1.4.1 固体平板(斜面)培养基(% , W/V)

蔗糖 1.0、牛肉浸膏 0.5、蛋白胨 0.3、酵母浸膏 0.1、琼脂粉 2.0。

#### 1.4.2 液体种子培养基(% , W/V)

蔗糖 1.0、蛋白胨 0.5、牛肉浸膏 0.3、酵母浸膏 0.1。

#### 1.4.3 摇瓶发酵培养基(% , W/V)

玉米淀粉 4.5、牛肉浸膏 0.15、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  0.05、 $CaCO_3$  0.3、大豆 0.3。

#### 1.4.4 罐发酵培养基(% , W/V)

玉米淀粉 5, 其它同摇瓶发酵培养基。

以上培养基均调 pH 至 7.2, 121°C 湿热灭菌 20min。

### 1.5 培养条件

#### 1.5.1 种子培养条件

挑取几环已分离纯化好的菌种,接入装有100ml种子液的500ml摇瓶中,28°C、220r/min摇床培养36h左右,刚起黏即停止。颜色黄棕色,无异臭,镜检。

#### 1.5.2 摇瓶发酵培养条件

接种量为10%(V/V),装液量为45ml/250ml三角瓶,于28°C,220r/min振荡培养66h。

#### 1.5.3 5L发酵罐培养条件

发酵培养基的体积为2L,接种量为10%(V/V),温度控制在28°C,0~24h转速为250r/min,通气量为3L/min;24h后为400r/min,5L/min。发酵周期为66h。

### 1.6 黄原胶的提取与产胶率计算

参照文献[6]方法。

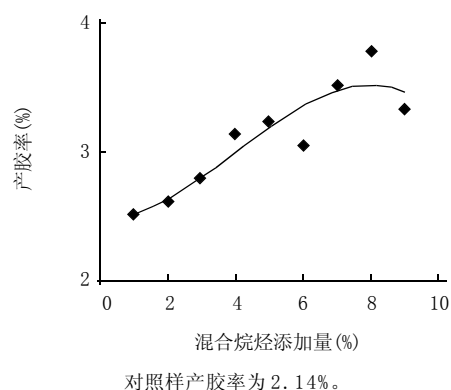
### 1.7 透射电镜观察<sup>[7]</sup>

将制备的各种待观察样品,不稀释直接沾铜网,2%磷钨酸复染色,用透射电镜观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 混合烷烃对黄原胶摇瓶发酵的影响

在发酵液分别加入0%(对照样),1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%和9%的混合烷烃作为试样,每组三个平行实验,研究其对黄原胶合成的影响,结果见图1。由实验结果可以发现,混合烷烃的添加量范围为7%~9%时,黄原胶产率的处于相对较高的水平,混合烷烃添加量为8%时产率提高最大,相对对照产胶量提高了约75%,可确定为最佳添加量。



对照样产胶率为2.14%。

图1 添加混合烷烃对产胶率的影响

Fig.1 Effects of amount of alkane mixture on xanthan gum yield

### 2.2 电镜观察摇瓶发酵不同时期菌体产胶情况

电镜观察实验组(添加8%混合烷烃)与对照组(不添加烷烃)在不同培养时期(24、36、48、60、66h)野油菜黄单胞杆菌 *Xanthomonas campestris* 2HL的荚膜情况,进一步验证混合烷烃作为携氧剂对黄原胶发酵的促进作用,结果见图2。

由图2可见,不同时期实验组和对照组的野油菜黄单胞菌菌体区别如下:(1)24h,菌体细胞周围都分泌有少量的呈灰白色的黄原胶,菌体呈黑灰色。由于处在发酵初期,发酵液黏度不高,溶氧水平足够,烷烃的作用不是很明显,两者的产胶情况几乎相同。(2)36h,菌体周围的灰白色物质即黄原胶开始增多,实验组的颜色更深、荚膜圈更大,烷烃的作用开始明显起来。(3)48h,实验组已不能观察到菌体,而对照组尚能观察到

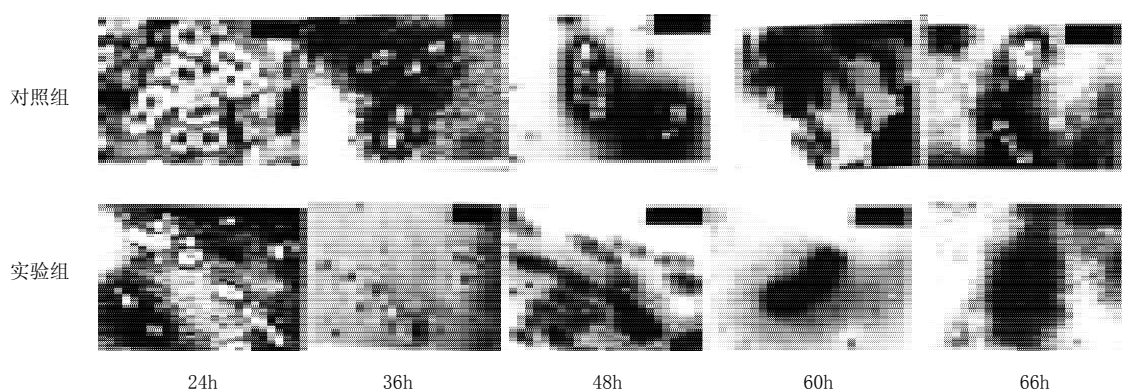


图2 不同发酵时期实验组和对照组的菌体电镜照片(放大倍数 10000 倍)

Fig.2 Strains observed by transmission electron microscope at different time of shaking flask fermentation(enlarging 10000)

灰黑色的菌体,说明实验组比对照组产生了更大量的黄原胶。(4) 60h,实验组的菌体周围已积累了大量的黑色的较厚的黄原胶,而对照组颜色较浅,产生的黄原胶较少。(5)在发酵结束的66h,对照组中难见菌体,且菌体变形严重,这表明菌体开始自溶;而实验组中的菌体周围仍然包有很厚的黄原胶,这表明菌体自溶滞后,发酵周期明显延长。由电镜实验结果印证了添加混合烷烃能提高溶氧水平,有利于菌体生长和黄原胶的分泌,有效延长发酵周期,明显提高黄原胶产率。

### 2.3 不同玉米淀粉含量下混合烷烃对黄原胶发酵的影响

在上述研究已得到混合烷烃最佳添加量(8%)的基础上,改变发酵培养基中碳源浓度(玉米淀粉)。含量依次为:3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%和6%,研究在添加了8%混合烷烃的条件下,能否提高碳源转

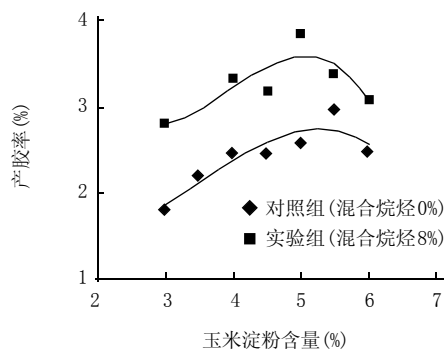


图3 培养基中不同玉米淀粉含量对产胶率的影响

Fig.3 Effects of content of corn starch on xanthan gum yield

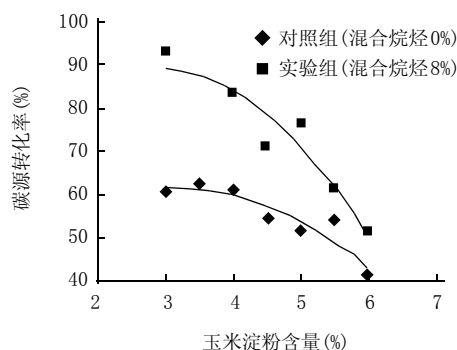


图4 培养基中不同玉米淀粉含量对碳源转化率的影响

Fig.4 Effects of content of corn starch on transformation rate of carbon source

化率,增加黄原胶产胶率,结果如图3、4所示。

可见,添加混合烷(8%)能明显提高碳源转化率和产胶率。玉米淀粉含量为5%时产胶率最高,为3.8%,较对照组提高了近50%,虽然此浓度下的碳源转化率并不很高,但其仍在80%以上,而且玉米淀粉来源广泛,价格低廉,因此玉米淀粉含量为5%是一个较合适地用量,在添加8%混合烷烃的条件下,玉米淀粉仍能较好地转化,黄原胶产胶率得到进一步的提高。

### 2.4 罐发酵实验

依据摇瓶试验的结果,进行了5L罐发酵验证,结果见表1。罐发酵的结果与摇瓶实验的结果基本一致,在含有5%的玉米淀粉培养基中添加8%的混合烷烃,可以很大程度提高黄原胶的产率。

## 3 结论

表1 罐发酵的实验结果

Table 1 Results of fermentor experiment

	发酵初始 pH 值	发酵终了 pH 值	平均产胶率 (%)	相对对照平均提高产胶量的百分率 (%)	平均碳源转化率 (%)
试验组	8.00	6.01	4.18	44.14	83.6
对照组	7.50	6.42	2.90	0	58.0

注:试验组,玉米淀粉5%+混合烷烃8%;对照组,玉米淀粉5%+混合烷烃0%。

# 抗水牛乳 $\beta$ -乳球蛋白兔 IgG 的亲纯化

李欣<sup>1,2</sup>, 陈红兵<sup>1,2,\*</sup>

(1. 南昌大学 食品科学教育部重点实验室, 江西 南昌 330047;

2. 南昌大学中德联合研究院, 江西 南昌 330047)

**摘要:** 为得到兔血清中纯度较高的特异性抗体, 通过将纯化的水牛乳  $\beta$ -乳球蛋白偶联到免疫亲和柱上, 用 3mol/L 氯化镁将特异性的 IgG 洗脱, 得到了 SDS-PAGE 纯的 IgG, 其蛋白含量为 5.8mg/ml, 经 ELISA 检测滴度为 1:109。本实验所建立的方法可用于纯化兔血清中特异性的 IgG。

**关键词:**  $\beta$ -乳球蛋白; IgG; 亲和层析

Affinity Purification of Rabbit IgG Against Buffalo's  $\beta$ -lactoglobulin

LI Xin<sup>1,2</sup>, CHEN Hong-bing<sup>1,2,\*</sup>

(1. Key Laboratory of Food Science, Ministry of Education, Nanchang University, Nanchang 330047, China

2. Sino-German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

**Abstracts:** In order to collect high purity rabbit antibody against buffalo's  $\beta$ -lactoglobulin,  $\beta$ -lactoglobulin was coupled into the medium of Sepharose 4B, and then the medium was eluted with 3 mol/L MgCl<sub>2</sub>. The results showed that electrophoretically pure of IgG is identified by SDS-PAGE, the protein content is 5.8 mg/ml, and the titer is 1:109 using ELISA. So the method established can be used to purify the specific IgG in rabbit serum.

**Key words**  $\beta$ -lactoglobulin; IgG; affinity chromatography

中图分类号: TS201.2.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)08-0276-04

$\beta$ -乳球蛋白是牛乳中含量较高的一种蛋白质, 存在于乳清中的主要过敏原之一, 严重影响了部分人群食用牛乳的安全性。婴幼儿对牛乳过敏的发生率相当高, 达到 2.8%, 而牛乳又是婴幼儿的主要食物来源,

牛乳过敏引起了人们的广泛关注。由于水牛乳中  $\beta$ -乳球蛋白与牛乳中的  $\beta$ -乳球蛋白存在着免疫交叉反应, 而且水牛乳  $\beta$ -乳球蛋白的相关研究报道很少。因此, 开展水牛乳  $\beta$ -乳球蛋白的研究具有重要学术价值。本研

收稿日期: 2007-06-08

\*通讯作者

基金项目: 国家自然科学基金项目(30560096); 长江学者和创新团队发展计划项目(IRT0540)

作者简介: 李欣(1980-), 女, 博士研究生, 研究方向为食品生物技术。

3.1 摇瓶发酵和 5L 发酵罐实验表明: 在玉米淀粉含量为 5% 时, 添加 8% 混合烷烃, 黄原胶的产率得到明显提高, 在罐发酵中达到 4.18% (对照样为 2.90%)。

3.2 在添加适量的混合烷(8%) 的条件下, 碳源转化率有较明显的提高, 在玉米淀粉含量为 5% 时, 罐发酵的碳源转化率达到 83.6% (对照样为 58.0%)。

3.3 通过电镜观察, 也印证了添加浓度为 8% 的混合烷烃有利于菌体生长和分泌黄原胶, 有效延长发酵周期。

参考文献:

- [1] FERNANDO F, TORRES L G, ENRIQUE G. Effect of the dissolved oxygen tension during cultivation of *X. campestris* on the production and quality of xanthan gum[J]. J Biotechnol, 1994, 34(2): 165-173.
- [2] PETERS HU, et al. Modeling of batchwise xanthan production[J]. Can J Chem Eng, 1992, 70(4): 742-750.
- [3] 贾士儒, 冈部满康. 添加氧载体提高泰尔菌素发酵的得率[J]. 微生物学通报, 1996, 23(6): 336-337.
- [4] 格利克 B R, 帕斯捷尔纳克 J J. 分子生物技术-重组DNA的原理与应用[M]. 3版. 陈丽珊, 任大明, 主译. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [5] 焦瑞身. 微生物工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [6] 杨文博. 微生物学实验[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [7] 刁虎欣, 梁兴杰, 梁凤来, 等. 野油菜黄单胞菌原生质体分泌黄原胶的电镜观察[J]. 微生物学通报, 2001, 28(5): 18-20.