

郑梅霞, 朱育菁, 刘波, 等. 地毯草黄单胞菌发酵生产黄原胶工艺条件优化 [J]. 福建农业学报, 2017, 32 (7): 762-767.
ZHENG M-X, ZHU Y-J, LIU B, et al. Optimized Fermentation for Production of Xanthan Gum Using *Xanthomonas axonopodis* [J].
Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2017, 32 (7): 762-767.

地毯草黄单胞菌发酵生产黄原胶工艺条件优化

郑梅霞¹, 朱育菁^{1*}, 刘波^{1*}, 黄素芳¹, 陈 峥¹, 张连宝^{1,2}

(1. 福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福建 福州 350003; 2. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘 要: 为了获得更高品质的黄原胶, 优化黄原胶高产菌株地毯草黄单胞菌 FJAT-10151 的发酵工艺, 通过单因素及正交设计对培养基(碳源、氮源和无机盐离子)和发酵条件(发酵时间、pH、装液量和接种量)进行优化, 试验获得最佳发酵培养基为葡萄糖 30 g·L⁻¹、豆粕粉 30 g·L⁻¹、KH₂PO₄ 2 g·L⁻¹、pH 值 9.0。在装液量 50 mL/250 mL、接种量 8% 培养条件下发酵 72 h, 黄原胶产量达到 21.0 g·L⁻¹, 是初始培养条件产量 8.65 g·L⁻¹ 的 2.43 倍。优化发酵工艺后, 黄原胶品质提高, 丙酮酸含量从 8.9% 升高到 16.3%, 而蛋白质含量从 15.27% 降低到 4.8%。

关键词: 地毯草黄单胞菌; 黄原胶; 正交设计

中图分类号: TS 201.3

文献标识码: A

文章编号: 1008-0384 (2017) 07-762-06

Optimized Fermentation for Production of Xanthan Gum Using *Xanthomonas axonopodis*

ZHENG Mei-xia¹, ZHU Yu-jing^{1*}, LIU Bo^{1*}, HUANG Su-fang¹, CHEN Zheng¹, ZHANG Lian-bao^{1,2}

(1. Agricultural Bio-resources Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fujzhou, Fujian 350003, China; 2. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

Abstract: Conditions of fermentation to produce extracellular xanthan gum by using *Xanthomonas axonopodis* FJAT-10151 were optimized to maximize quality of the gum. Single factor and orthogonal experiments on medium composition (including sources of carbon, nitrogen and inorganic ions) and fermentation conditions (including pH, time duration, fill volume and inoculum ratio) were conducted. It was found that using a medium consisting of glucose 30 g·L⁻¹, soybean cake powder 30 g·L⁻¹, and KH₂PO₄ 2 g·L⁻¹ at pH 9.0 with a filled culture of 50 mL containing 8% of inoculum per 250 mL flask, a yield of 21.0 g·L⁻¹ of xanthan gum could be obtained after fermentation for 72 h. The production capacity was 243% higher than that prior to the optimization. More importantly, a higher quality of xanthan gum with the content of pyruvic acid increased from 8.9% to 16.3% and the content of protein decreased from 15.27% to 4.8% was realized.

Key words: *Xanthomonas axonopodis*; xanthan gum; orthogonal design

微生物多糖种类繁多, 因其独特性质在多个行业具有重要应用。黄原胶是黄单胞菌发酵生产的一种重要微生物多糖, 具有悬浮性、乳化性、增稠性、耐酸碱盐和假塑性等^[1-2], 在食品、化妆品和石油等行业具有广泛的应用^[3-5]。国际上对黄原胶的需求以 7%~8% 的速度逐年增加, 国内生产的黄原胶存在产品质量低下、生产得率较低等问题, 无法满足国内市场需求, 距国际市场的需求尚有较

大差距^[6]。

目前可产黄原胶的菌种有野油菜黄单胞菌 *Xanthomonas campestris*^[7-8]、野油菜黄单胞菌的变种^[9]和地毯草黄单胞菌^[10]等。黄原胶的产量和质量不仅受菌株^[2]的影响, 而且也受培养基中营养物质种类和培养条件的影响^[8]。黄原胶是由 D-葡萄糖、D-甘露糖、D-葡萄糖醛酸、乙酰基和丙酮酸构成, 丙酮酸含量影响黄原胶的性质^[11]。发酵

收稿日期: 2017-02-03 初稿; 2017-05-21 修改稿

作者简介: 郑梅霞 (1986-), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 微生物生物技术 (E-mail: zhengmeixia2005@163.com)

* 通讯作者: 刘波 (1957-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 微生物生物技术与农业生物药物 (E-mail: fzliubo@163.com)

朱育菁 (1972-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 农业生物药物与生物防治的研究 (E-mail: zyjingfz@163.com)

基金项目: 福建省科技计划项目——省属公益类科研院所基本科研专项 (2015R1018-2); 福建省农业科学院科技创新项目 (2015CX-7)

工艺条件的优化对黄原胶产量和质量都具有重要影响，在黄原胶的实际工业生产中具有重要意义。产黄原胶工艺条件的优化主要是对碳源、氮源、无机盐离子、发酵时间、pH、装液量、接种量等的优化^[7]，主要有正交试验法^[12]和响应面法^[13]。

为了获得高品质的黄原胶，提高地毯草黄单胞菌 *Xanthomonas axonopodis* FJAT-10151 产黄原胶的产量和质量，采用正交试验法对 FJAT-10151 发酵生产黄原胶的碳源、氮源、无机盐离子、发酵时间、pH、装液量和接种量等工艺条件进行优化，为其商业化应用提供指导。

1 材料与方法

1.1 菌株

地毯草黄单胞菌 *Xanthomonas axonopodis* FJAT-10151，保存于中国微生物菌种保藏中心。

1.2 培养基与试剂

氢氧化钠、蔗糖、葡萄糖、麦芽糖、乳糖均购自国药集团化学试剂有限公司；盐酸购自浙江三鹰化学试剂有限公司；牛肉浸粉购自北京陆桥技术有限责任公司；酵母浸粉、蛋白胨、琼脂均购自北京奥博生物技术有限责任公司；玉米淀粉购自源叶生物；CaCl₂、MgSO₄、KH₂PO₄ 购自西陇化工股份有限公司，MnSO₄ 购自天津市恒星化学试剂有限公司；FeSO₄ 购自天津市福晨化学试剂厂；CuSO₄ 购自天津市大茂化学试剂厂；以上试剂均为分析纯，豆饼粉为自制黄豆研磨粉。

活化培养基：TSB 培养基（美国 BD 公司）；种子培养基：蔗糖 20 g·L⁻¹、蛋白胨 5 g·L⁻¹、酵母浸粉 5 g·L⁻¹、pH7.0。发酵培养基：葡萄糖 30 g·L⁻¹、蛋白胨 10 g·L⁻¹、酵母浸粉 10 g·L⁻¹、KH₂PO₄ 2.5 g·L⁻¹、pH7.0，装液量为 50 mL/250 mL。

1.3 发酵液的制备

菌种活化：将菌种 FJAT-10151 接种在 TSB 培养基上，于 28℃ 恒温培养 24 h；种子扩大培养：挑取 FJAT-10151 单菌落接种到种子培养基，30℃ 170 r·min⁻¹ 培养 16 h，扩大培养；摇瓶发酵：发酵培养基装液量 50 mL/250 mL、接种量 5%、28℃、170 r·min⁻¹ 摇床培养 72 h。

1.4 黄原胶提取方法

将发酵液离心分离，收集上清液。在上清液中加入 3 倍体积冰乙醇沉降黄原胶，4℃ 静置过夜。离心分离后，用无水乙醇洗涤 3 遍，氮气吹干，称量备用。

1.5 单因素试验

本研究分别选用 30 g·L⁻¹ 玉米淀粉、葡萄糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖为不同碳源，30 g·L⁻¹ 豆饼粉为氮源，2 g·L⁻¹ KH₂PO₄ 为无机盐离子，pH 7，装液量 50 mL/250 mL、接种量 5%、28℃、170 r·min⁻¹ 摇床培养 72 h 后，制备黄原胶，每个处理设置 3 个平行重复，筛选发酵培养基的最优碳源。

选择最优碳源，如上述方法探讨氮源（30 g·L⁻¹ 蛋白胨、酵母浸粉、牛肉浸粉、豆饼粉）、无机盐离子（2 g·L⁻¹ KH₂PO₄、MgSO₄、CaCl₂、FeSO₄、CuSO₄、MnSO₄）、发酵时间（12、24、36、48、60、72、84、96、108、120 h）、pH、装液量（25、50、75、100、125 mL/250 mL）、接种量（2%、4%、6%、8%、10%）对黄原胶产量的影响。

1.6 正交试验

选择影响较大的 3 个因素：葡萄糖、豆饼粉、KH₂PO₄ 为发酵因素，每个因素各选 3 个水平，按 L₉ (3⁴) 正交表设计发酵试验，每组 3 个平行，试验设计见表 1。

表 1 L₉ (3⁴) 正交试验分析因素与水平
Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

因素	因素/(g·L ⁻¹)		
	葡萄糖	豆饼粉	KH ₂ PO ₄
—1	20	10	1
0	30	20	2
1	40	30	4

1.7 黄原胶质量的测定

苯酚-硫酸法^[14]测定黄原胶中中性多糖的含量：0.1 g 黄原胶溶于 100 mL 超纯水中，取 0.4 mL 黄原胶溶液，超纯水补足至 1 mL，加入 0.5 mL 6% 苯酚溶液和加 3 mL 浓硫酸，震荡混匀后沸水浴 20 min，冷却至室温，在 490 nm 处测定吸光度，以葡萄糖为对照。

咪唑法^[15]测定黄原胶中丙酮酸的含量：0.1 g 黄原胶溶于 100 mL 超纯水中，取 1 mL 黄原胶溶液，超纯水补足至 4 mL，加入 10 mL 浓硫酸硼砂溶液，冰浴冷却至 4℃，沸水浴 10 min 后冰浴冷却至 4℃。再加入 0.2 mL 咪唑试剂，摇匀，沸水浴 15 min 后冰浴冷却至 4℃，在 530 nm 处测定吸光度，以葡萄糖醛酸为对照。

考马斯亮蓝法^[16]测定黄原胶中蛋白的含量：

0.1 g 黄原胶溶于 100 mL 超纯水中, 取 1 mL 黄原胶溶液, 加入 5 mL 的考马斯亮蓝 G-250 溶液, 摇匀, 放置 5 min 后, 在 580 nm 下比色测定吸光度, 以牛血清白蛋白为对照。

1.8 地毯草黄单胞菌的透射电镜观察

离心发酵液收集菌体, 超纯水洗涤 3 次, 采用负染法对不同发酵时间的菌体进行透射电镜观察。用 3% 戊二醛固定样品后铜网底片, 再用 1% 的磷钨酸染色, 干燥后用透射电子显微镜观察。

2 结果与分析

2.1 碳源对 FJAT-10151 黄原胶产量的影响

碳源对黄原胶产量的影响见图 1, 以葡萄糖为碳源时, 黄原胶的产量明显高于其他碳源, 虽与以麦芽糖为碳源相当, 但因葡萄糖价格比麦芽糖便宜, 因此选择最优碳源为葡萄糖。

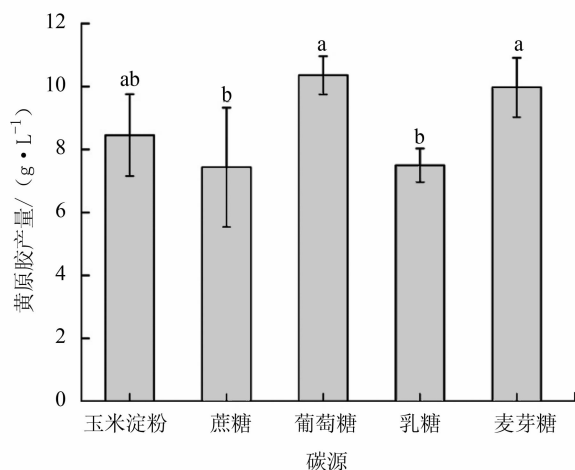


图 1 黄原胶产量随碳源的变化

Fig. 1 Change on xanthan gum production by varying carbon source

注: 图上不同字母表示经 Duncan 法检测在 0.05 水平上差异显著, 下同。

2.2 氮源对 FJAT-10151 黄原胶产量的影响

氮源对黄原胶产量的影响见图 2, 以豆饼粉为氮源时, 黄原胶的产量明显高于其他氮源, 差异显著, 因此最优氮源为豆饼粉。

2.3 无机盐离子对 FJAT-10151 黄原胶产量的影响

无机盐的需求量虽然很少, 但与菌体生长和发酵正常进行都有密切关系。本研究选用的无机盐离子对黄原胶产量的影响见图 3, 添加 KH_2PO_4 使黄原胶的产量显著高于空白对照; 添加 MgSO_4 基本没有影响; 添加 CaCl_2 、 CuSO_4 、 FeSO_4 、 MnSO_4 会抑制黄原胶的生产; 只有添加适合的无机盐才能

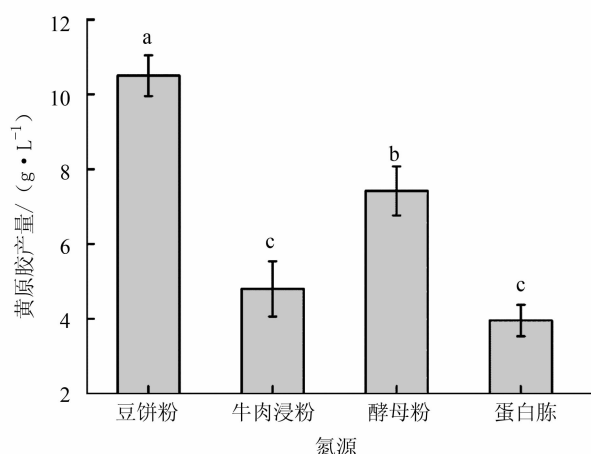


图 2 黄原胶产量随氮源的变化

Fig. 2 Change on xanthan gum production by varying nitrogen source

促进黄原胶的合成, 因此选择最优无机盐为 KH_2PO_4 。

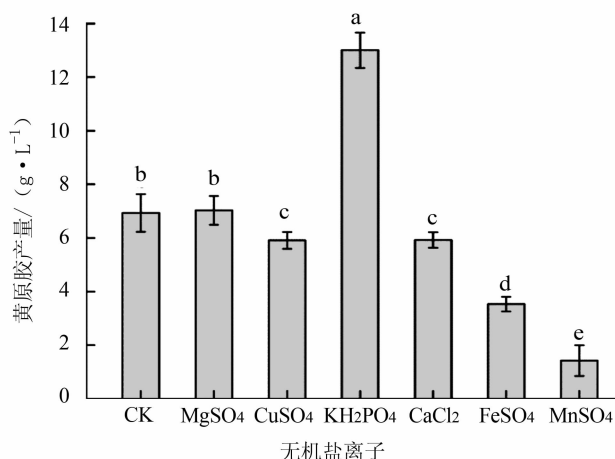


图 3 黄原胶产量随无机盐离子的变化

Fig. 3 Change on xanthan gum production by varying inorganic salt addition

2.4 发酵时间对 FJAT-10151 黄原胶产量的影响

发酵时间对黄原胶产量的影响见图 4, 黄原胶的产量随发酵时间的延长而增大, 当发酵时间超过 72 h, 黄原胶产量基本保持不变, 所以选择最佳发酵时间为 72 h。

2.5 装液量对 FJAT-10151 黄原胶产量的影响

装液量不同导致体系中的氧含量不同, 只有合适的装液量, 才能满足空间的高效利用, 利于体系通气, 以及菌株对营养的摄入。本研究选用的装液量对黄原胶产量的影响见图 5, 当装液量为 25 mL/250 mL 时, 碳源的转化率高, 但发酵后期由于营养物质不足阻碍发酵进行, 从而影响黄原胶的

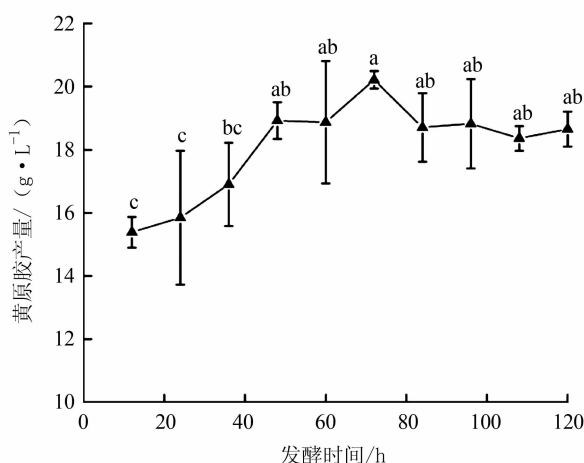


图4 黄原胶产量随发酵时间的变化

Fig. 4 Change on xanthan gum production by varying fermentation time

产量；当装液量为 75、100、125 mL/250 mL 时，由于溶氧不足，营养物质未充分利用，碳源的转化率低，因而黄原胶产量也不高；当装液量为 50 mL/250 mL，兼顾溶氧量和营养物利用率，利于黄原胶的合成，因此选择最优装液量为 50 mL/250 mL。

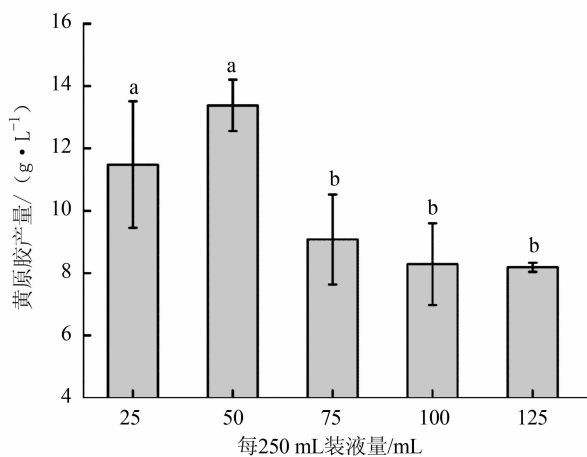


图5 黄原胶产量随装液量的变化

Fig. 5 Change on xanthan gum production due to filled culture volume

2.6 初始 pH 对 FJAT-10151 黄原胶产量的影响

发酵液初始 pH 对黄原胶产量的影响见图 6，初始 pH 9.0 时，黄原胶的产量最大，因此选择最优初始 pH 为 9.0。

2.7 接种量对 FJAT-10151 黄原胶产量的影响

接种量对黄原胶产量的影响见图 7，接种量为 8% 时，黄原胶的产量最大，且离散度最小，3 个平行之间差异小，重现性好，利于工厂化生产，因

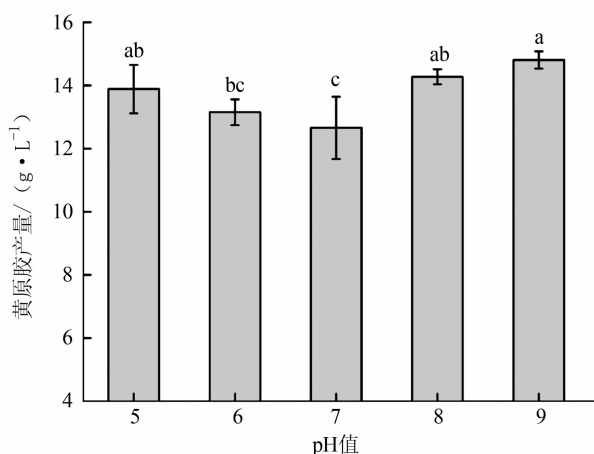


图6 黄原胶产量随初始 pH 的变化

Fig. 6 Change on xanthan gum production due to initial pH of medium

此选择最优接种量为 8%。

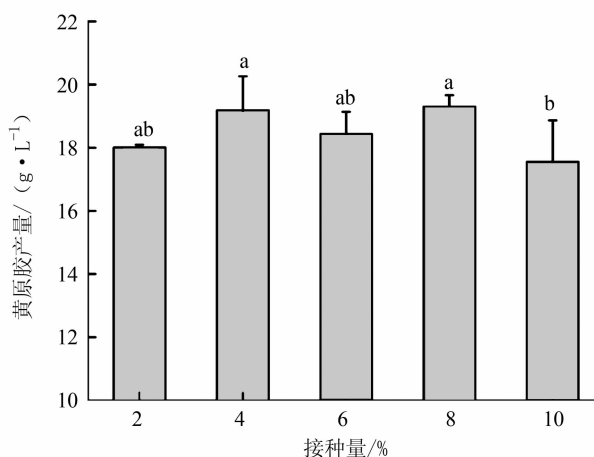


图7 黄原胶产量随接种量的变化

Fig. 7 Change on xanthan gum production due to inoculation

2.8 最优发酵培养基的选择

正交试验结果见表 2。培养基中选用葡萄糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、豆饼粉 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 KH_2PO_4 $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (5 号样本) 时，黄原胶产量 $17.713 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 最大。极差分析，比较 R 值，豆饼粉 $>$ 葡萄糖 $>$ KH_2PO_4 ，说明豆饼粉对黄原胶产量的影响最大，无机盐离子 KH_2PO_4 对黄原胶产量的影响最小。黄原胶产量与葡萄糖和豆饼粉的质量浓度正相关，所以选择葡萄糖质量浓度 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、豆饼粉质量浓度 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ；黄原胶产量与 KH_2PO_4 质量浓度不成正相关，当 KH_2PO_4 质量浓度为 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时黄原胶的产量最大，对该质量浓度的培养基进行验证，黄原胶的产量为 $18.267 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。当葡萄糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时的转

化率为 59.04%，40 g · L⁻¹ 时的转化率为 45.67%，综合考虑成本问题，选择葡萄糖 30 g · L⁻¹、豆饼粉 30 g · L⁻¹、KH₂PO₄ 2 g · L⁻¹ 为最优发酵培养基，黄原胶产量为 21.0 g · L⁻¹，是初始培养条件产量 8.65 g · L⁻¹^[19] 的 2.43 倍。

表 2 正交优化结果极差分析
Table 2 Range analysis on orthogonal test results

水平	因素/(g · L ⁻¹)			黄原胶产量/ (g · L ⁻¹)
	葡萄糖	豆饼粉	KH ₂ PO ₄	
1	40	30	1	15.29±1.83
2	20	20	4	13.61±1.22
3	40	10	4	11.14±0.55
4	20	30	2	14.39±0.48
5	30	30	4	17.71±1.02
6	40	20	2	16.34±0.19
7	30	20	1	13.83±0.43
8	30	10	2	12.07±0.37
9	20	10	1	9.51±0.09
低	20	10	1	—
中	30	20	2	—
高	40	30	4	—
I	0.625	0.545	0.644	—
II	0.713	0.730	0.713	—
III	0.727	0.790	0.708	—
R	0.102	0.245	0.070	—

2.9 黄原胶质量的变化

黄原胶的品质测定见表 3，优化培养基后获得的黄原胶中丙酮酸含量升高，蛋白质含量降低，黄原胶品质更高。

表 3 黄原胶中中性糖、丙酮酸和蛋白质的含量
Table 3 Neutral sugar, pyruvic acid and protein contents in xanthan gum produced from fermentation

项目	中性糖 /%	丙酮酸 /%	蛋白质 /%
标准曲线	葡萄糖	葡萄糖醛酸	牛血清白蛋白
相关系数(R ²)	0.9980	0.9982	0.9980
黄原胶 1	36.81	8.9	15.27
黄原胶 2	25.3	16.3	4.8

注：黄原胶 1：基础培养基提取的黄原胶^[10]；黄原胶 2：优化培养基后提取的黄原胶。中性糖线性方程为 OD_{490nm}=0.0331C_{Glu}+0.1151；丙酮酸线性方程为 OD_{530nm}=15.256C_{GlcA}+0.0782；蛋白质线性方程为 OD_{580nm}=0.0293C_{BSA}+0.4233。

2.10 地毯草黄单胞菌的电镜观察

地毯草黄单胞菌 FJAT-10151 菌体的透射电镜扫描图如图 8 所示，明显看到丝状的黄原胶，菌体外面形成了厚厚的荚膜，黄原胶聚集或缠绕在细胞表面，且许多菌体通过黄原胶连在一起。

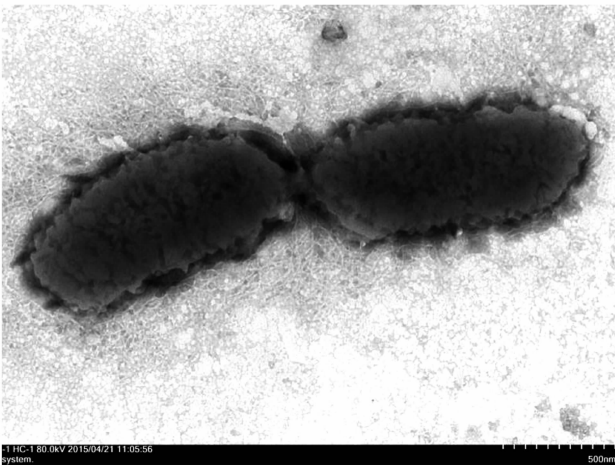


图 8 地毯草黄单胞菌 FJAT-10151 的透射电镜观察
Fig. 8 Electron microscopy of *X. axonopodis* FJAT-10151

3 讨论与结论

黄原胶是次生代谢物，处于对数生长期的菌体细胞不合成分泌丝状的黄原胶，只有终止生长后的细胞才合成分泌丝状黄原胶^[17]。本研究通过优化碳源、氮源、无机盐离子、发酵时间、pH、装液量、接种量等，缩短菌株的生长期和延长稳定期，从而提高黄原胶的产量。

本研究通过正交试验获得地毯草黄单胞菌 FJAT-10151 发酵生产黄原胶的最优工艺条件：葡萄糖 30 g · L⁻¹、豆饼粉 30 g · L⁻¹、KH₂PO₄ 2 g · L⁻¹、装液量 50 mL/250 mL、初始 pH 9.0、接种量 8%、发酵时间 72 h，黄原胶产量为 21.0 g · L⁻¹，是初始产量 8.65 g · L⁻¹^[10] 的 2.43 倍，提高了 143%。

黄原胶中丙酮酸含量与其品质密切相关，它赋予黄原胶良好的拟塑性和低剪切速率下的高黏度特性^[18]，田益玲等^[19]利用丙酮酸含量控制黄原胶质量。通过不同菌种、不同工艺和配方获得的黄原胶，其丙酮酸含量差别很大^[20]。地毯草黄单胞菌 FJAT-10151 在优化发酵工艺后，可以获得更高品质的黄原胶：丙酮酸含量从 8.9% 升高到 16.3%，是程蓉等^[21]优化野油菜黄单胞菌培养基获得黄原胶（丙酮酸含量 4.82%）的 3.4 倍，是莫晓燕

等^[12]优化野油菜黄单胞菌培养基获得黄原胶(丙酮酸含量3.32%)的4.9倍;另外,蛋白质含量从15.27%降低到4.8%。

本研究优化生产黄原胶发酵工艺条件,提高了黄原胶的产量、改善了黄原胶的胶体性能。

参考文献:

- [1] 吉武科,李振平.黄原胶的应用与发展前景[J].中国食品添加剂,1994,(4):27-30.
- [2] GARCÍA-CHOA F, SANTOS V E, CASAS J A, et al. Xanthan gum: production, recovery, and properties [J]. Biotechnology Advances, 2000, 18 (7): 549-579.
- [3] ESQUENET C, BUHLER E. Aggregation Behavior in Semidilute Rigid and Semirigid Polysaccharide Solutions [J]. Macromolecules, 2002, 35 (9): 3708-3716.
- [4] SPICLIN P, HOMAR M, ZUPANCIC-VALANT A, et al. Sodium ascorbyl phosphate in topical microemulsions [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2003, 256 (1-2): 65-73.
- [5] 马天玲,于娟,朱海霞,等.黄原胶的生产应用及发展趋势[J].新疆石油科技,2007,(2):27-30.
- [6] 颜震,吴尽,朱希强,等.黄原胶发酵工艺条件的优化研究[J].食品与药品,2006,8(11):39-42.
- [7] KALOGIANNIS S, IAKOVIDOU G, LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES M, et al. Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses [J]. Process Biochemistry, 2003, 39 (2): 249-256.
- [8] PALANIRAJ A, JAYARAMAN V. Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* [J]. Journal of Food Engineering, 2011, 106 (1): 1-12.
- [9] 张超凤,范丽君,李情敏,等.突变型黄单胞杆菌产黄原胶条件的优化[J].中国酿造,2016,35(5):92-96.
- [10] 郑梅霞,朱育菁,刘波,等.微生物多糖胶质高产菌株的筛选与鉴定[J].食品科学,2016,37(15):171-178.
- [11] 程蓉,张永奎,张春红,等.高丙酮酸黄原胶的发酵研究[J].食品工业科技,2008,29(3):234-236.
- [12] 莫晓燕,吉丽娜,詹谷宇.黄原胶发酵培养基优化研究[J].工业微生物,2003,33(2):15-18.
- [13] SOMAS S K, LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES M, KYRIAKIDIS D A. Optimization study of xanthan gum production using response surface methodology [J]. Biochemical Engineering Journal, 2007, 35 (3): 273-280.
- [14] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. Analytical Chemistry, 1956, 28 (3): 350-356.
- [15] 梁涛.微生物胞外多糖-结冷胶提取工艺研究[D].杭州:浙江大学,2011.
- [16] 王孝平,邢树礼.考马斯亮蓝法测定蛋白含量的研究[J].天津化工,2009,23(3):40-42.
- [17] 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.
- [18] 秦志刚,詹晓北,贾薇,等.高丙酮酸黄原胶发酵与流变特性研究[J].食品与发酵工业,2007,33(1):32-35.
- [19] 田益玲,沈磊,祝彦忠,等.丙酮酸荧光分光光度法在黄原胶质量控制上的应用[J].中国食品学报,2006,6(1):79-82.
- [20] 张禹,张国佩,张茶,等.提高黄原胶丙酮酸含量的发酵实践[J].食品工业科技,2002,22(9):30-31.

(责任编辑:张梅)