

文章编号:1673-1689(2009)02-0284-05

# 海洋细菌 B-1106 生长特性及产胞外多糖研究

赵焕平, 祖国仁\*, 孔繁东, 刘阳

(大连工业大学 生物与食品工程学院, 辽宁 大连 116034)

**摘要:** 对从海泥中筛选到的 1 株海洋细菌 B-1106 的生长特性及产胞外多糖进行了初步研究。结果表明, 海洋细菌 B-1106 耐盐度为 4 g/dL, 培养基初始 pH 7.0~8.0, 在淡水及海水培养基中产糖量时间均为 96 h, 产胞外多糖的较佳碳源、氮源分别为蔗糖和硫酸铵, 较佳碳氮源质量浓度比为 10:1。

**关键词:** 海洋细菌; 胞外多糖; 生长特性

**中图分类号:** Q 539

**文献标识码:** A

## Study on the Growth Characteristic and Exopolysaccharide of Marine Bacteria B-1106

ZHAO Huan-ping, ZU Guo-ren\*, KONG Fan-dong, LIU Yang

(School of Biological and Food Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

**Abstract:** The manuscript investigated the growth characteristic and exopolysaccharide on one marine bacteria B-1106 isolated from oozed sea water. The result indicated that the salt tolerance for strain B-1106 was 4%, initial pH was 7.0~8.0. Strain B-1106 fermented in fresh culture medium or in sea culture medium 96 h could produce higher exopolysaccharides. The best carbon source and nitrogen source for strain B-1106 producing exopolysaccharide were sucrose and ammonium sulfate, respectively. and the carbon-nitrogen ratio was 10:1.

**Key words:** marine bacteria, exopolysaccharide, growth characteristic

多糖广泛地存在于动物细胞膜、植物和微生物细胞壁中<sup>[1]</sup>。海洋微生物胞外多糖是其在代谢过程中分泌到细胞壁外的多糖或多糖复合物。特殊的海洋环境, 导致了海洋生物体内多糖的合成过程与陆地生物不同, 并产生许多结构新颖作用特殊的活性物质, 促进多种免疫缺损疾病<sup>[4]</sup>等功能。近年来, 人们对海洋微生物胞外多糖的结构和生物活性的研究取得了显著的进展<sup>[5-6]</sup>。海洋微生物胞外多糖在医药、食品、化工等领域都有着广阔的应用前景。作者对从大连黑石礁海区潮间带海泥中筛选

得到的一株海洋细菌进行了生长特性以及产胞外多糖的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 菌株** 海洋细菌 B-1106, 从大连黑石礁海区潮间带海泥中分离得到。

**1.1.2 培养基** 基础发酵培养基: 蔗糖 5 g, 酵母膏 0.5 g, 玉米浆 0.8 g, 碳酸钙 0.15 g, 海水 60

收稿日期: 2008-03-11

\* 通讯作者: 祖国仁(1963-), 男, 吉林四平人, 工学硕士, 副教授, 主要从事微生物活性物质研究。Email: rgz321@163.com

mL,蒸馏水 40 mL;种子培养基:葡萄糖 1 g;蛋白胨 0.2 g;酵母膏 0.1 g;蒸馏水 40 mL;海水 60 mL;试管斜面培养基:种子培养基加 2 g/dL 琼脂。

**1.1.3 仪器** ZHWY-2102C 空气恒温振荡器,上智城分析仪器制造有限公司产品;YXQ-SG46-280SA 手提式高压消毒器,上海市医疗仪器厂产品;TGL-16G 高速离心机,上海安亭科学仪器厂产品;722 型分光光度计,上海分析仪器厂产品。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 测定方法** 多糖的测定:取定量发酵液于 3 000 r/min 离心 20 min,取上清液,加 3 倍体积分数 95%乙醇,4℃冰箱沉淀,将沉淀物溶于水,加 1 倍氯仿正丁醇混合溶液去蛋白质,取上清液,加 3 倍体积分数 95%乙醇,冰箱沉降,沉淀物溶于一定量的水,苯酚-硫酸法测定胞外多糖<sup>[7]</sup>。

残糖的测定<sup>[8]</sup>:取定量发酵液,3 000 r/min 离心 20 min,取上清液,苯酚-硫酸法测定总糖。总糖减去多糖即为培养基残糖。

生物量的测定<sup>[8]</sup>:取定量的菌体培养液,稀释一定的倍数后,用 722 分光光度计在 600 nm 下测定 OD 值,以空白培养基作为对照。

**1.2.2 培养条件试验** 生长特性试验:海洋细菌 B-1106 试管斜面活化,接入装有 5 mL 种子培养基的试管中,200 r/min,28℃摇床振荡培养 24 h,接入装有 30 mL/dL 基础发酵培养基的三角瓶中,摇床培养一定时间,按方法 1.2.1 测定生物量,考察 NaCl 质量浓度、培养基初始 pH 值对海洋细菌 B-1106 生长的影响及海洋细菌 B-1106 在淡水培养基和海水培养基中生长情况。

产胞外多糖试验:海洋细菌 B-1106 试管斜面活化,接入装有 5 mL 种子培养基的试管中,200 r/min,28℃摇床振荡培养 24 h,接入装有 30 mL/dL 基础发酵培养基的三角瓶中,28℃摇床培养一定时间,按方法 1.2.1 测定胞外多糖,考察淡水培养基、海水培养基、碳源、氮源和碳氮比对海洋细菌 B-1106 产胞外的多糖的影响。

## 2 结果与讨论

### 2.1 生长特性试验

#### 2.1.1 NaCl 浓度对海洋细菌 B-1106 生长的影响

以蒸馏水分别配制 0、1、2、3、4、5、6、7 g/dL 氯化钠质量浓度的基础发酵培养基,按方法 1.2.2 进行生长特性试验,结果见图 1。

海洋微生物通常生活在高盐、高压、低温、低营养和低光照的特殊生态环境中,一般的海洋微生物

能够在 3~4 g/dL 盐质量浓度下很好的生长。由图 1 可见,随着 NaCl 质量浓度的增加,海洋细菌 B-1106 生物量逐渐增加,在 3~4 g/dL 的 NaCl 质量浓度时生长良好,4 g/dL 的 NaCl 质量浓度时达到最大生物量。随着 NaCl 质量浓度的增加,菌体的生长明显受到了抑制。说明海洋细菌 B-1106 具有一定的耐盐性,海洋微生物的特点比较明显。

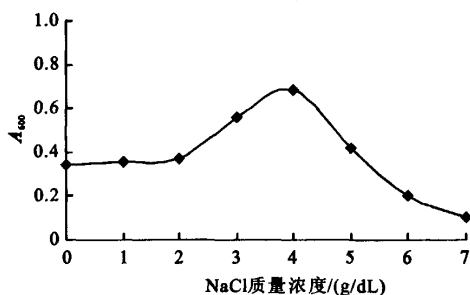


图 1 NaCl 质量浓度对海洋细菌 B-1106 生长的影响

Fig.1 Effect of NaCl content on the growth of marine bacterium B-1106

**2.1.2 培养基的初始 pH 值对海洋细菌 B-1106 生长的影响** 在上述基础发酵培养基中加入质量浓度为 4 g/dL 的 NaCl,分别调取初始 pH 值为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0,灭菌后 pH 值降低 0.2~0.3,培养海洋细菌 B-1106 进行生长特性试验,结果见图 2。

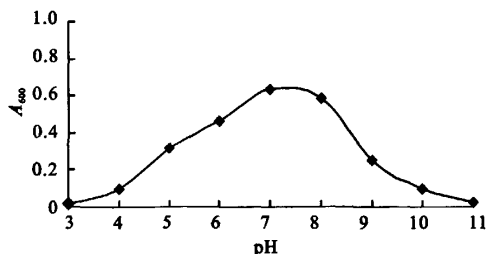


图 2 培养基初始 pH 值对海洋细菌 B-1106 生长的影响

Fig.2 Effect of the initial pH on the growth of marine bacterium B-1106

各类微生物生长繁殖的最适 pH 条件各不相同,培养基的 pH 必须控制在一定的范围内,才能满足不同类型微生物的生长繁殖或产生代谢产物的需要。由图 2 可以看出,海洋细菌 B-1106 在较低或较高 pH 值下不生长或生长不好,pH 值在 7.0~8.0 范围生长较好,与陆生细菌类似,pH 7.0 生长达到高峰。

#### 2.1.3 淡水培养基对海洋细菌 B-1106 生长及产胞

外多糖的影响 用蒸馏水配制基础发酵培养基,培养基的初始 pH 值为 7.0~8.0, NaCl 质量浓度为 4 g/dL,按方法 1.2.2 进行试验,摇床培养时间分别为 24,48,72,96,120,144 h,测定海洋细菌 B-1106 生长、产胞外多糖及培养基残糖情况,结果见图 3。

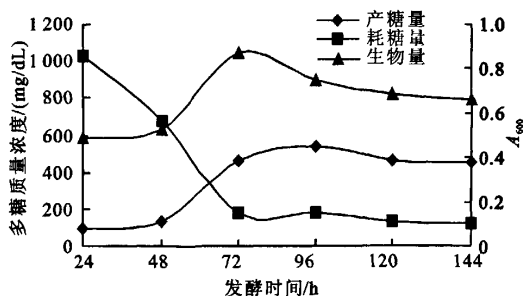


图3 海洋细菌 B-1106 在淡水培养基中的生长及产糖情况

Fig. 3 Growth and producing exopolysaccharides of marine bacterium B-1106 in freshwater culture medium

从图 3 可见,海洋细菌 B-1106 在 NaCl 质量浓度为 4 g/dL 的淡水培养基中能够生长良好,从 24 h 开始生长逐渐加快,48 h 进入了对数生长期,72 h 生长达到高峰,随后进入稳定期,菌体不再发生变化。而在菌株生长初期,碳源消耗的速度比较快,72 h 后碳源变化差别不大。多糖的产生是随着时间逐渐增大,从 24 h 产糖,但产糖高峰时间并不是菌体生长高峰时间,而是菌体生长进入稳定期 96 h,产糖达到最大量。

**2.1.4 海水培养基对海洋细菌 B-1106 生长及产胞外多糖的影响** 用海水配制基础发酵培养基,调 NaCl 质量浓度为 4 g/dL,培养基的初始 pH 值为 7.0~8.0,按方法 1.2.2 进行试验,摇床培养时间分别为 24,48,72,96,120,144 h,测定海洋细菌 B-1106 生长、产胞外多糖及培养基残糖情况,结果见图 4。

海洋是一个非常复杂的系统,海水是海洋环境的固有特性,海水中含有许多溶解性气体和海洋生物所必须的各种矿物质<sup>[9]</sup>。从图 4 可见,海洋细菌 B-1106 在以海水配置的培养基中生长情况与淡水基本相似,但生长速度要相对慢一些,96 h 才达到生长高峰并进入稳定期。而对碳源糖的利用速度也比较淡水的慢,前 48 h 碳源消耗速度较慢,48~72 h 时间段耗碳源速度较快,72 h 以后碳源缓慢消耗。产糖前 48 h 也比较慢,48 h 后开始逐渐加快,与生长高峰同步 96 h 达到最大,产糖高峰时间与淡

水培养基时间一样,但产糖量要高于在淡水培养基中产糖量,可达到 682.3 mg/dL。

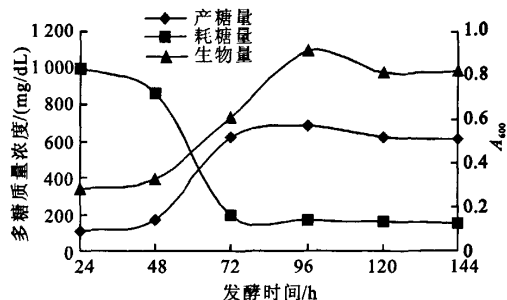


图4 海洋细菌 B-1106 在海水培养基中的生长及产糖情况

Fig. 4 Growth and producing exopolysaccharides of marine bacterium B-1106 in seawater culture medium

## 2.2 产胞外多糖试验

### 2.2.1 碳源对海洋细菌 B-1106 产胞外多糖的影响

选取基础发酵培养基中质量浓度为 5 g/dL 的碳源分别为:葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、甘露醇、乳糖。菌种经试管斜面活化后,取一环接入装有 5 mL 种子培养基的试管中,200 r/min,28 °C 摇床振荡培养 24 h,接入装有 30 mL/dL 基础发酵培养基的三角瓶中,28 °C 摇床培养 48 h,按方法 1.2.1 进行产胞外多糖试验,结果见图 5。

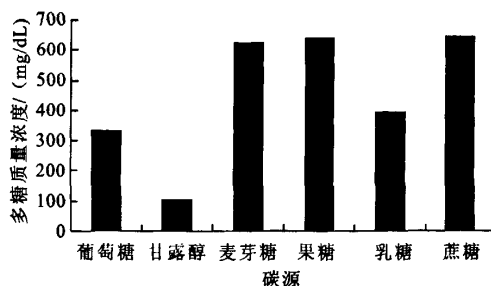


图5 碳源对海洋细菌 B-1106 产胞外多糖的影响

Fig. 5 Effect of carbon sources on exopolysaccharides production by marine bacterium B-1106

碳源是菌体增殖和多糖积累的主要基质,微生物生长及多糖产量均受碳源种类和加入量的影响。碳源物质在细胞内经过一系列复杂的化学变化后成为微生物自身的细胞物质(如糖类、脂、蛋白质等)和代谢产物,碳可占一般细菌细胞干重的一半。微生物利用碳源物质具有选择性,糖类是一般微生物较容易利用的良好碳源和能源物质,但是微生物对不同糖类物质的利用也有差别。由图 5 可见,在所

提供的不同碳源中,麦芽糖、果糖和蔗糖作为碳源时,海洋细菌 B-1106 产胞外多糖效果相差不大。作者选用蔗糖作为碳源,工业蔗糖来源广泛,而且价格便宜,并且蔗糖除含有丰富的单糖碳源外,还含有各种氨基酸及维生素,提供了良好的营养生长环境。

### 2.2.2 氮源对海洋细菌 B-1106 产胞外多糖的影响

选取基础发酵培养基中质量浓度为 0.5 g/dL 的氮源分别为:蛋白胨、尿素、酵母膏、硫酸铵、氯化铵、硝酸钠。菌种经试管斜面活化后,取一环接入装有 5 mL 种子培养基的试管中,200 r/min,28 ℃ 摇床振荡培养 24 h,接入装有 30 mL/100 mL 基础发酵培养基的三角瓶中,28 ℃ 摇床培养 48 h,按方法 1.2.1 进行产胞外多糖试验,结果见图 6。

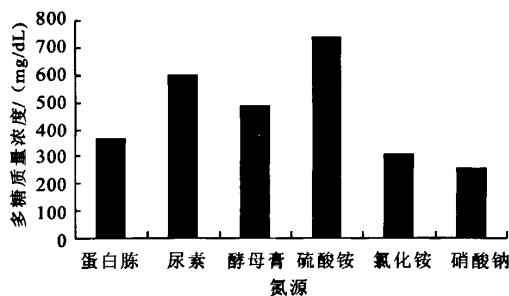


图 6 氮源对海洋细菌 B-1106 产胞外多糖的影响

Fig. 6 Effect of nitrogen sources on exopolysaccharides production by marine bacterium B-1106

细胞干物质中氮的含量仅次于碳和氧。氮是组成核酸和蛋白质的重要元素,氮对微生物的生长发育有着重要作用。从分子态的氮到复杂的含氮化合物都能够被不同微生物所利用,而不同类型的微生物能够利用的氮源差异较大。从图 6 可以看出,在所提供的不同氮源中,海洋细菌 B-1106 以硫酸铵作为氮源时,产糖效果最佳。

**2.2.3 碳、氮源质量浓度比对海洋细菌 B-1106 产胞外多糖的影响** 以前期碳、氮源质量浓度单因素试验为基础,选取发酵培养基中硫酸铵的质量浓度为 0.5 g/dL,分别调取蔗糖的质量浓度为 2,3,4,5,6 g/dL,使蔗糖与硫酸铵的质量比例分别为 4:1,6:1,8:1,10:1,12:1。菌种经试管斜面活化后,取一环接入装有 5 mL 种子培养基的试管中,

200 r/min,28 ℃ 摇床振荡培养 24 h,接入装有 30 mL/dL 基础发酵培养基的三角瓶中,28 ℃ 摇床培养 48 h,按方法 1.2.1 进行产胞外多糖试验,结果见图 7。

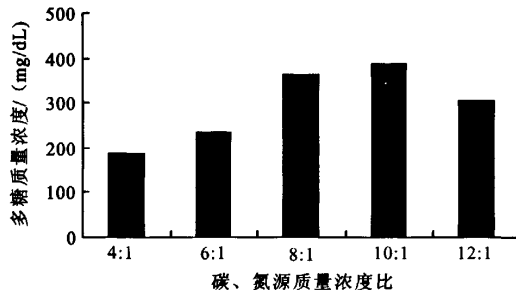


图 7 碳、氮源质量浓度比对海洋细菌 B-1106 产胞外多糖的影响

Fig. 7 Effect of carbon-nitrogen ratio on exopolysaccharides production by marine bacterium B-1106

微生物的生长与培养基质中的营养物质及营养物质的浓度有密切的关系,只有选择较佳的营养物质和浓度,微生物才能良好的生长。除此之外,培养基中各营养物质之间的浓度配比也直接影响微生物的生长繁殖、代谢产物的形成和积累,其中碳、氮比影响最大,在一定的碳氮比下微生物可能大量繁殖,而在另一种碳氮比下微生物可能开始产生积累代谢产物。工业上是通过不同时期控制不同的碳、氮比来实现连续化生产的,作者仅以产糖量来考察碳氮比。从图 7 可见,当碳、氮比为 10:1 时,海洋细菌 B-1106 产胞外多糖效果最好。

## 3 结 语

1) 海洋细菌 B-1106 在淡水及海水培养基中均能较好的生长,NaCl 质量浓度为 4 g/dL,培养基初始 pH 值为 7.0~8.0。

2) 海洋细菌 B-1106 在淡水及海水培养基中生长高峰时间分别为 72 h 和 96 h,产糖高峰时间均为 96 h。在海水培养基中,海洋细菌 B-1106 生长相对淡水培养基较慢,但产糖量高于淡水培养基。

3) 海洋细菌 B-1106 产胞外多糖较佳碳源、氮源分别为蔗糖和硫酸铵,碳氮源质量浓度比为 10:1。

## 参考文献(References):

[1] 张桂和,赵谋明,王伟,等.方格星虫多糖分离纯化及性质鉴定[J].食品与生物技术学报,2006,25(4):63-66.

ZHANG Gui-he,ZHAO Mou-ming,WANG Wei, et al. Isolation, purification and property identification of polysaccharide

- contained in sipunculus nudus[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2006,25(4):63—66. (in Chinese)
- [2] Hong-Xi X,Spencer H S,Song F,et al. Isolation and characterization of an anti-HSV polysaccharide from *Prunella vulgar* [J]. **Antiviral Research**,1999,44:43—54.
- [3] H Yamada,K S Ra,H Kiyohara,et al. Structural characterization of an anti-complenentary pectic polysaccharide from the roots of *Bupleurum falcatum* L[J]. **Carbohydrate Research**,1989,189:209—226.
- [4] Jinyou D,Xuesong W,Qun D,et al. Structural features of a pectic arabinogalactan with immunological activity from the leaves of *Diospyros kak*[J]. **Carbohydrate Research**,2003,338:1291—1297.
- [5] 陈真,郭青龙,钱之玉,等. 海洋真菌多糖 YCP 对荷瘤小鼠的抗肿瘤作用[J]. 食品与生物技术学报,2005,24(5):1—5.  
CHEN Zhen ,GUO Qing-long ,QIAN Zhi-yu ,et al. Study on the tumor inhibitory effect of YCP (a marine fungal polysaccharide) [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology** , 2005,24(5):1—5. (in Chinese)
- [6] 张珊珊,王长云,魏小雷,等. 微生物胞外多糖结构与生活活性研究进展[J]. 微生物学通报,2007,(34):153—156.  
ZHANG Shan-shan,WANG Chang-yun,WEI Xiao-lei,et al. Progress of the research on the structure and bioactivities of marine exopolysaccharide[J]. **Microbiology Report** , 2007,(34):153—156. (in Chinese)
- [7] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 上海:上海科学技术出版社,1987.
- [8] 郑忠辉,刘三震,黄益丽,等. 海洋细菌 1202 菌株产胞外多糖的适宜条件[J]. 厦门大学学报:自然科学版,2003,42(5):661—664.  
ZHENG Zhong-hui ,LIU San-zhen ,HUANG Yi-li,et al. Suitable culture conditions for exopolysaccharides produced by marine bacterial strain 1202 [J]. **Journal of Xiamen University:Natural Science Edition**,2003,42(5):661—664. (in Chinese)
- [9] 林永成. 海洋微生物及其代谢产物[M]. 北京:化学工业出版社,2002.

(责任编辑:朱明)

## 《食品与生物技术学报》 广 告 费 收 费 标 准

### 彩色广告

|    |           |
|----|-----------|
| 封面 | 15000 元/期 |
| 封二 | 8000 元/期  |
| 封三 | 6000 元/期  |
| 封底 | 10000 元/期 |
| 内页 | 5000 元/期  |

### 黑白广告

|      |          |
|------|----------|
| 整版内页 | 2000 元/期 |
| 补白   | 800 元/期  |

地址:江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号 江南  
大学杂志社

邮编:214122

联系电话:0510—85913526

《食品与生物技术学报》广告部