

## 海洋放线菌胞外多糖发酵工艺及其条件研究\*

蔡慧农<sup>1</sup> 郭彩华<sup>1</sup> 陈锦芳<sup>1</sup> 黄耀坚<sup>2</sup> 苏文金<sup>\*\*1,2</sup><sup>(1)</sup>集美大学 生物工程学院 厦门 361021)<sup>(2)</sup>厦门大学 生命科学学院 细胞生物学和肿瘤细胞工程教育部重点实验室 厦门 361005)

**提要** 以具有明显海洋特性的、产胞外免疫活性多糖的链霉菌 2305 菌株作为发酵菌种,对其胞外多糖的发酵工艺及其条件进行了研究,考察了不同碳源、氮源、水质、培养基初始 pH 值、发酵温度、通气量等因素对发酵菌种的生物量及胞外多糖产量等的影响,建立和优化了胞外多糖摇瓶发酵培养基配方、发酵工艺及发酵条件,胞外多糖产量达到 4.58 g/L,转化率达到 6.90%。研究了发酵过程中菌体生物量、底物糖残余量、pH 值、产物多糖积累量等的动态变化,分析讨论了 2305 菌株胞外多糖发酵的动力学类型。

**关键词** 海洋放线菌,胞外多糖,发酵**中图分类号** TQ929<sup>+.2</sup> **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)07-0075-06

已有的大量实验证明,某些特定结构的多糖能够激活各类免疫细胞,从而增强机体的抗肿瘤、抗病毒、抗心血管疾病等能力,是一类理想的免疫调节剂<sup>[1~5]</sup>。近年来,从海洋生物中分离筛选免疫活性多糖的研究已成为海洋活性物质研究的热点之一,并已取得令人鼓舞的成就<sup>[6~8]</sup>。如海洋细菌胞外多糖“海拿登”(Marinactan),由于其特殊的多糖成分和显著的抗肿瘤活性,现已进入多糖抗肿瘤新药的临床阶段<sup>[6]</sup>。海洋微生物多糖除了其结构新颖、生物活性强等特点之外,还具有便于利用现代微生物发酵技术进行生产、无原材料后顾之忧、易于实现产业化等优点,是最具有开发前景的可再生性药源,因此海洋微生物活性多糖的研究备受关注<sup>[9]</sup>。

本研究的前期工作已报道了分离自福建厦门海区潮间带的链霉菌(*Streptomyces* sp.)2305 菌株具有明显的海洋微生物属性,其产生的胞外多糖具有显著的非特异性免疫、细胞免疫及体液免疫增强活性<sup>[10]</sup>。本文则以该菌株作为发酵菌种,对其胞外多糖的发酵基质、培养基配方、发酵工艺条件及发酵过程进行研究,旨在探索海洋放线菌的发酵特性,为海洋放线菌胞外(活性)多糖的进一步研究及发酵生产提供便利与基础。

## 1 材料与amp;方法

## 1.1 材料

1.1.1 实验菌株 海洋放线菌 2305 菌株,分离自厦门海区潮间带水浮莲(*Pistia stratiotes* L.)残体上,属于链霉菌属(*Streptomyces* sp.)粉红孢类群<sup>[10]</sup>。

1.1.2 陈海水与人造海水的制备 取干净海水,在阴暗处放置 2~3 周,用滤纸过滤后作为陈海水用;以 3%氯化钠自来水溶液作为人造海水用。

1.1.3 培养基的制备 1)斜面培养基:以人造海水配制的高氏一号培养基制成;2)液体种子培养基:葡萄糖 20.0 g,酵母膏 10.0 g, KNO<sub>3</sub> 1.0 g, MgSO<sub>4</sub> 0.5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, FeSO<sub>4</sub> 0.01 g,用人造海水溶解至

\* 国家 863 计划项目 819-05-08 号;福建省教育厅项目 K2001100 号。

第一作者:蔡慧农,出生于 1957 年,副教授,研究方向:生物工程。E-mail:bec-chn@jmu.edu.cn

\*\* 通讯作者:苏文金,出生于 1955 年,教授,博导,从事生物工程研究。

收稿日期:2002-10-18;修回日期:2003-05-05

1 000 mL; 3) 基础培养基: KNO<sub>3</sub> 1.0 g, MgSO<sub>4</sub> 0.5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, FeSO<sub>4</sub> 0.01 g, 用人造海水溶解至 1 000 mL; 4) 发酵培养基: 基础培养基加入一定量的糖、酵母膏等, 具体见各实验。

以上各培养基均于灭菌前调 pH 7.2~7.4, 以 121 °C 高压灭菌 20 min 后冷却待用。

## 1.2 方法

1.2.1 菌种活化与液体种子培养 实验室收藏的菌种, 接种于斜面培养基, 28 °C 活化培养 5 d, 将活化的斜面菌种转接入液体种子培养基中 (50 mL / 500 mL 三角瓶), 28 °C 下振荡培养 3 d, 供多糖发酵接种用。

1.2.2 接种 摇瓶发酵用液体菌种接种, 常规接种量 6%。

1.2.3 摇瓶发酵 以同一型号、规格的 500 mL 三角瓶分装发酵培养基 (常规装液量: 50 mL / 瓶), YPL-1 型迴转式恒温调速摇瓶柜 (迴转直径 2.5 cm) 振荡培养, 常规转速 200 r/min、温度 28 °C。

1.2.4 发酵液产物多糖定量 发酵结束后, 摇瓶发酵液经补水至原有体积, 离心去除菌体, 上清液加 3 倍体积 95% 乙醇溶液, 置 4 °C 下 2 h 后离心 (1 000 r/min, 20 min) 去上清, 沉淀以蒸馏水按原体积溶解, 用硫酸苯酚法测定多糖的产量<sup>[11]</sup>。

1.2.5 发酵液残糖定量 1) 葡萄糖、果糖残留量: 发酵结束后, 摇瓶发酵液补水至原有体积, 用斐林试剂热滴定法测定。2) 蔗糖、乳糖残留量的测算: 发酵结束后, 摇瓶发酵液经补水至原有体积, 离心去除菌体, 取上清液用铁氰化钾滴定法测定总糖量 (g/L)<sup>①</sup>, 然后按下式测算: 蔗糖 (乳糖) 残留量 (g/L) = 总糖量 (g/L) - 1.11 × 多糖量 (g/L)。式中多糖量即 1.2.4 测得的多糖产量。

1.2.6 菌体干质量测定 发酵液用事先经烘干质量恒定的滤纸过滤收集菌体, 以蒸馏水洗涤 6~8 遍后烘干至质量恒定, 用分析天平称取质量。

1.2.7 转化率计算 产物多糖生成量对底物糖总消耗量的比值, 作为转化率。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵培养基及发酵条件的建立与优化

2.1.1 不同碳源的影响与选择 大多数发酵所用的碳源主要是葡萄糖、果糖等各种单糖, 二糖 (如蔗糖、乳糖等), 淀粉等。鉴于淀粉为多糖, 易与本实验的产物多糖混淆而不利于产物多糖的分离、提取与测

定, 实验中比较了葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖分别作为碳源对菌体生长及多糖发酵的影响。基础培养基添加 30 g/L 酵母膏后, 分别添加 40 g/L 的葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖作为碳源, 常规接种、28 °C 摇瓶发酵 7 d, 考核其菌体生物量与多糖产量, 所得结果如表 1。

表 1 不同碳源对多糖发酵的影响

Tab.1 Effects of different carbon sources on the polysaccharide fermentation

碳源	菌体生物量 (g/L)	多糖产量 (g/L)	残糖量 (g/L)	转化率 (%)
葡萄糖	6.34	2.74	1.88	7.19
果糖	6.26	2.68	1.76	7.08
蔗糖	5.51	1.97	4.12	5.49
乳糖	2.32	0.82	24.41	5.26

可见葡萄糖、果糖、蔗糖均适合作为该菌株多糖发酵的碳源, 以葡萄糖较好; 而乳糖则因糖耗较慢且转化率较低而不适合。

2.1.2 葡萄糖初始添加量的影响 实验考察了葡萄糖初始添加量对多糖发酵的影响, 其结果如表 2。

表 2 葡萄糖初始添加量对多糖发酵的影响

Tab.2 Effects of the initial adding amount of glucose on the polysaccharide fermentation

葡萄糖初始 添加量 (g/L)	菌体生物量 (g/L)	多糖产量 (g/L)	残糖量 (g/L)	转化率 (%)
20	5.67	2.49	1.73	13.63
40	6.34	2.74	1.88	7.19
60	9.48	3.52	3.32	6.21
80	8.76	3.14	7.96	4.34

注: 基础培养基添加各用量的葡萄糖及酵母膏 30 g/L, 常规接种, 28 °C 摇瓶发酵 7 d。

由表 2 可知, 发酵培养基中葡萄糖初始添加量对菌体生物量、多糖产量及转化率均有明显影响, 当葡萄糖初始添加量为 60 g/L 时, 菌体生物量与多糖产量最高; 在实验范围内, 葡萄糖初始添加量越低, 其转化率越高, 而葡萄糖初始添加量越高, 其转化率越低。

① 陈佳荣编. 食品检验与分析. 厦门: 集美大学水产学院, 1998

2.1.3 不同氮源的影响与选择 实验中比较了豆饼水解液、蛋白胨、酵母膏作为氮源对多糖发酵的影响。在基础培养基上,添加葡萄糖(60 g/L)作为

碳源,添加不同浓度的豆饼水解液、蛋白胨、酵母膏作为氮源,常规接种,28℃摇瓶发酵7d,结果如表3。

由表3可见,添加酵母膏的效果最好,在实验范

表3 不同氮源及其用量对多糖发酵的影响

Tab.3 Effects of different nitrogen sources and their amount on the polysaccharide fermentation

氮源及用量(%)	酵母膏			蛋白胨			豆饼水解液		
	1	2	3	1	2	3	2	4	6
多糖产量(g/L)	1.27	2.60	3.41	1.21	1.42	1.96	1.02	1.24	1.69
残糖(g/L)	7.34	3.92	3.37	16.02	13.24	7.86	28.50	19.95	11.41
转化率(%)	2.41	4.64	6.02	2.75	3.04	3.76	3.27	3.10	3.48

围内,产物多糖的产量及转化率均随着酵母膏添加量的提高而提高,添加2%左右的酵母膏即可保证将残糖量压到5g/L以下;而添加蛋白胨及豆饼水解液不但耗糖速度慢,且转化率也差。这些差别,除了与氮源物质的提供有关外,可能还与维生素或其它物质的提供有关,有待进一步研究。

2.1.4 不同水质的影响与选择 本实验菌株分离自海区,因此实验中比较了其在以海水、人造海水和自来水为基质的发酵培养基下的菌体生物量和多糖产量。结果见表4。

表4 不同水质的发酵培养基对多糖发酵的影响

Tab.4 Effects of different water quality in the fermentation medium on the polysaccharide fermentation

水质	菌体生物量 (干质量 g/L)	多糖产量 (g/L)	残糖量 (g/L)	转化率 (%)
陈海水	8.05	2.89	3.36	5.10
人造海水	9.80	3.25	3.25	5.73
自来水	4.95	1.98	5.58	3.64

注:不同水质的基础培养基,葡萄糖60 g/L、酵母膏30 g/L,28℃摇瓶发酵7d。

实验结果显示,2305菌株在人造海水为基质的发酵条件下,生物量为自来水中的1.98倍,多糖产量为1.64倍。这表明该菌株具有较强的海洋微生物属性。

2.1.5 培养基初始pH的影响 培养基的初始pH值对发酵微生物的生长及代谢有一定的影响。实验中,以基础培养基上添加葡萄糖60 g/L、酵母膏30 g/L作为发酵培养基,高温灭菌后,以0.1 mol/L的NaOH或HCl溶液调节不同的初始pH值(以精密pH试纸测定)。接种后,28℃摇瓶发酵7d。实验结果列

于表5。

表5 培养基初始pH值对多糖发酵的影响

Tab.5 Effects of initial pH of the culture medium on the polysaccharide fermentation

初始pH	菌体生物量 (干质量 g/L)	多糖产量 (g/L)	残糖量 (g/L)	转化率 (%)
5.0	9.12	3.26	3.38	5.76
6.0	9.25	3.50	3.27	6.17
7.0	9.42	3.35	3.34	5.91
8.0	9.40	3.21	3.21	5.65
9.0	8.95	2.73	4.37	4.91

由表5结果可以看出,培养基初始pH值在5.0~8.0范围内,菌体生物量、多糖产量及多糖转化率差异都很小;当培养基初始pH值调到9.0时,多糖产量则有明显下降。因此,培养基的初始pH值宜调在6.0~7.0范围内。

2.1.6 摇瓶装液量的影响 放线菌一般为好氧型微生物。实验中,借助同一型号、规格(体积500 mL)的三角瓶分装不同体积的液体发酵培养基(基础培养基添加葡萄糖60 g/L、酵母膏30 g/L)即装液量的不同来模拟不同通风量对发酵(28℃下振荡发酵7d)的影响,所得实验数据以装液量为横坐标值,菌体生物量、多糖产量、转化率等指标值为纵坐标值作图,如图1。

由图1可见,装液量大小对菌体生物量及多糖产量影响明显。在实验范围内,装液量为40 mL时,多糖产量最大,转化率最高;而装液量为80 mL时,菌体生物量最大。提示适合于多糖积累的供氧量大于菌体最适生长所需的供氧量。随着装液量的提高,供氧不足,菌体生长和糖耗速度受到抑制,多糖转化率也明显下

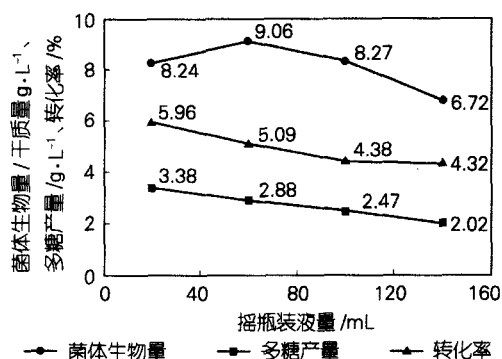


图1 摇瓶装液量对多糖发酵的影响

Fig. 1 Effects of culture medium amount in shake flask on the polysaccharide fermentation

降,导致多糖产量下降。显然,2305菌株属于好氧微生物,其胞外多糖发酵属于好氧型发酵。

2.1.7 发酵温度与初始糖浓度的优化 培养基的初始糖浓度、发酵温度、发酵周期三者在发酵过程中具有紧密的互动联系,三者的协调是一个优化的发酵工艺的基本要求。为了获得较高的多糖产量,实验中采用固定发酵周期7 d,同时提高初始糖浓度与发酵温度的方案,进行交互试验,考察培养基初始葡萄糖添加量分别为50、60、70、80、90 g/L,发酵温度分别为28、30、32℃下的菌体生物量与多糖产量,所得结果列于表6。

表6 培养基初始葡萄糖添加量与发酵温度对多糖发酵的影响

Tab.6 Effects of the fermentation temperature and the initial adding amount of glucose on the polysaccharide fermentation

初始葡萄糖浓度(g/L)	菌体干质量(g/L)			多糖产量(g/L)		
	28℃	30℃	32℃	28℃	30℃	32℃
50	9.85	9.86	9.62	4.01	4.07	3.97
60	9.76	9.81	9.88	3.95	4.14	4.19
70	9.68	9.90	10.00	3.78	4.27	4.39
80	9.23	10.10	10.13	3.81	3.97	4.05
90	9.25	9.26	9.32	3.45	3.63	3.84

注:基础培养基中添加酵母膏40 g/L;各做2个重复。

由表6结果可见:当初始葡萄糖添加量为50 g/L时,发酵温度以28~30℃为最适,提高发酵温度并不能提高菌体生物量与多糖产量;随着初始葡萄糖添加量在50~70 g/L范围内的提高以及发酵温度在

28~32℃范围内的提高,多糖产量达到了最高(4.39 g/L);随着初始糖浓度在50~80 g/L范围内的提高以及发酵温度在28~32℃范围内的提高,菌体生物量达到了最高(10.13 g/L);在32℃下,多糖产量在初始糖浓度超过70 g/L后就开始受到抑制,而菌体生物量则在初始糖浓度超过80 g/L后才受到抑制,二者并不一致。

结果表明,固定发酵周期为7 d,将初始糖浓度及发酵温度分别提高到70 g/L及32℃,能进一步提高多糖产量。

## 2.2 摇瓶发酵过程动态

根据上述实验结果,以基础培养基添加葡萄糖70 g/L、酵母膏40 g/L作为发酵培养基,装液量50 mL(500 mL三角瓶),经高压灭菌后调初始pH6.0,常规接种,32℃下摇瓶发酵,定时采样监测发酵过程中pH、残糖量、菌体生物量、多糖产量等项参数,绘制成摇瓶发酵过程曲线图(图2)。

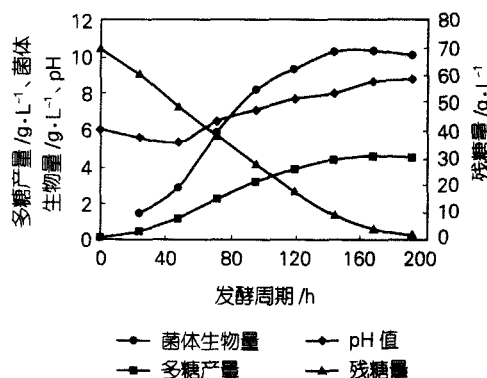


图2 摇瓶发酵过程曲线

Fig. 2 Process of the polysaccharide fermentation in shaking flask

分析摇瓶发酵过程曲线可见:该发酵过程的菌体生长迟滞期较长,约48 h;产物多糖在发酵开始时接近于0(0.07 g/L,可能由接种的种子液带入),发酵开始后的48 h内合成较缓慢,48 h后合成速度加快,至168 h积累达到高峰,产量达4.58 g/L,对应的转化率为6.90%;可以直观地看出,在整个发酵过程中,多糖生成量与菌体生物量之间可能具有正相关关系;当残糖量下降到5%左右(144 h)时,菌体生物量不再增加,产物多糖合成也趋于缓慢,发酵液pH值加速回升。根据产物多糖积累量峰值对应的时间,可以确定发酵周期应以168 h为宜。

### 3 讨论

对发酵过程中产物多糖的生成量与菌体的生物量作相关性分析(图3),可见在整个发酵过程中,产物多糖的生成量与菌体的生物量呈密切正相关,属于直线回归模型。因此,该多糖的发酵动力学类型属于“生长-产物合成耦合型”。

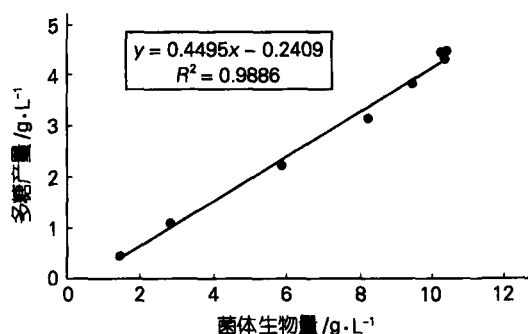


图3 多糖产量与菌体生物量的相关性分析

Fig.3 Correlation between yields of the EPS and the biomass

国内关于微生物多糖的研究,主要集中于陆源微生物,尤其是食用、药用真菌多糖的研究,已有大量的报道,其中包括了大量的发酵生产工艺方面的报道<sup>[12-14]</sup>。海洋生物多糖的研究方面,业已开展了一定的工作<sup>[15,16]</sup>,但海洋微生物多糖的研究,则仅见有极少的报道<sup>[17,18]</sup>,有关海洋微生物发酵生产胞外多糖的工艺研究,在国内乃未见报道。

海洋微生物代谢产物的发酵工艺及其条件的研究,有助于了解海洋微生物及其代谢产物的发酵特性,为海洋微生物代谢产物的发酵生产积累必要的资料。本文对2305菌株胞外多糖的发酵工艺及其条件进行了研究,为该海洋放线菌胞外多糖的大量获取并对其作进一步的结构、活性方面的研究提供了便利,也为该胞外多糖的工业化发酵生产提供了必要的基础。

#### 参考文献

- 1 吴波,梁谋,佟丽,等. 茯苓多糖抗肿瘤作用机理实验研究. 中国药理学通报, 1994, 6(1): 23-31
- 2 王运红,徐家敏,耿美玉,等. 海洋硫酸多糖916对实验性高脂血症大鼠血浆中含硫氨基酸的测定. 中国海洋

药物, 2000, (4): 23-25

- 3 丁华,耿美玉. 海洋硫酸多糖911抗艾滋病毒作用及其机理研究. 中国海洋药物, 2000, (6): 4-9
- 4 朱海波,耿美玉,管华诗. 海洋硫酸多糖DPS对大鼠平滑肌细胞增殖的影响. 中国海洋药物, 2000, (2): 18-20
- 5 Franz G. Polysaccharides in Pharmacy: current applications and future concepts. Plant Medica, 1989, 16(2): 163-170
- 6 Umezawa H, Okami Y, Kurasawa S, et al. Marinactan, an antitumor polysaccharides produced by marine bacteria. J Antibiotics, 1983, 36(5): 471-477
- 7 Sogawa K, Sumida T, Hamakawa H, et al. Inhibitory effect of the marine microalgal polysaccharide on the telomerase activity in K562 cell. Res Communicat Mol Pathol Pharmacol, 1998, 99(3): 259-265
- 8 Okutani K, Shigeta S. Inhibitory effect of sulfate derivatives of a marine bacterial polysaccharide on replication of human immuno-deficiency virus in vitro. Nippon Suisan Gakkaishi, 1993, 59(8): 1 433
- 9 Okami Y. Marine microorganisms as a source of bioactive agents. Microb Ecol, 1986, 12: 65-78
- 10 苏文金,黄益丽,黄耀坚,等. 产免疫调节活性多糖海洋放线菌的筛选. 海洋学报, 2001, 23(6): 114-119
- 11 张惟杰主编. 复合多糖生化研究技术. 上海: 上海科学技术出版社, 1987
- 12 方庆华,中建江. 灵芝真菌发酵生产灵芝多糖和灵芝酸. 华东理工大学学报, 2001, 27(3): 254-257
- 13 赵明文,吴燕娜,李玉祥,等. 蛹虫草产胞外多糖的液体优化培养条件研究. 中国食用菌, 2000, 19(4): 30-32
- 14 沈蓉,张德操,王永安,等. 银耳孢子多糖高产菌株的选育及其发酵条件的研究. 渝州大学学报(自然科学版), 1993, 25(1): 57-65
- 15 张欣华,杨海波,于媛,等. 不同培养条件对海洋微藻多糖含量的影响. 生物学杂志, 2000, 17(6): 17-18
- 16 杜昱光,张铭俊,张虎,等. 海洋寡糖工程药物——壳寡糖制备分离新工艺及其抗癌活性研究. 中国微生物杂志, 2001, 13(1): 5-7
- 17 胡谷平,余志刚,吴耀文,等. 南海海洋红树林内生真菌胞外多糖的研究. 中山大学学报(自然科学版), 2002, 41(1): 121-122
- 18 余志刚,胡谷平,吴耀文,等. 南海红树林真菌(1356号)多糖分离提取及甲醇降解研究. 中山大学学报(自然科学版), 2001, 40(6): 123-124

研究报告 *REPORTS*

# A STUDY ON THE FERMENTATION TECHNOLOGY FOR A MARINE ACTINOMYCES EXTRACELLULAR POLYSACCHARIDE

CAI Hui-Nong<sup>1</sup> GUO Cai-Hua<sup>1</sup> CHEN Jin-Fang<sup>1</sup> HUANG Yao-Jian<sup>2</sup> SU Wen-Jin<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>*School of Biotechnology, Jimei University, Xiamen, 361021*)

(<sup>2</sup>*Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering and School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, 361005*)

**Received:** Oct., 18, 2002

**Key Words:** Marine actinomycetes, Extracellular polysaccharides(EPS), Fermentation

## Abstract

Using the strain of marine actinomycetes 2305, which produces extracellular polysaccharides(EPS) with immunomodulating activity, as a fermentative strain, the fermentation process and the fermentation conditions for the EPS are studied. A suitable medium and a suitable shaking culture condition are established, and the yield of the EPS reaches 4.58 g/L. The changes of the biomass yield, residual glucose concentration, pH, productivity of the EPS through the fermentation course are studied, and the fermentation kinetic type for the EPS is discussed.

(本文编辑:张培新)