

文章编号:1673-1689(2005)05-0006-05

利用 *Pseudoalteromonas elyakouii* 菌株发酵法 生产褐藻胶寡糖培养基的改进

张香治, 薛长湖*, 许萍, 赵雪, 张永勤

(中国海洋大学 生命科学与技术部, 山东 青岛 266003)

摘要: 利用 *Pseudoalteromonas elyakouii* 菌株发酵降解相对分子质量 10 000 左右的褐藻胶, 制备褐藻胶寡糖。为了达到降低培养基成本和简化分离工艺的目的, 使用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源的发酵培养基来代替使用蛋白胨为氮源的发酵培养基。为了促进菌的生长和发酵产物褐藻胶寡糖的生成, 在新发酵培养基中分别添加海带浸液、葡萄糖、乳糖、几种氨基酸和几种代谢中间产物(丙酮酸、柠檬酸、延胡索酸、尿素), 并考察这些成分对菌生长和发酵产物褐藻胶寡糖生成的影响。研究发现: 在基本培养基中和添加 0.1 g/L 的 L-谷氨酰氨、0.1 g/L 尿素或 0.1 g/L 柠檬酸时可获得较高的产物浓度。

关键词: 褐藻胶; 发酵; 培养基; 海带浸液; 氨基酸; 尿素; 柠檬酸

中图分类号: TQ 920

文献标识码: A

Improvement of Fermentation Medium to Produce Oligosaccharides of the Alginate by Strain *Pseudoalteromonas elyakouii*

ZHANG Xiang-zhi, XUE Chang-hu*, XU Ping, ZHAO Xue, ZHANG Yong-qin

(Division of Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: In this article, the strain *Pseudoalteromonas elyakouii* was used to hydrolyze alginate (the molecular weight is about 10 000) to oligosaccharides of the alginate through fermentation. To reduce the cost of the fermentation medium and simplify the purification process, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was used as the solo-nitrogen-resource to replace the peptone in the medium. Seaweed extract, glucose, lactose, some amino acids, pyruvic acid, citric acid, fumaric acid, and urea were added into the medium to improve the fermentation performance. The effect of these substances was investigated, and the results showed that, the product (oligosaccharides of the alginate) concentration in fermentation broth achieved high level when adding 0.1 g/L L-glutamine, 0.1 g/L citric acid, and 0.1 g/L urea, respectively.

Key words: alginate; fermentation; medium; seaweed extract; amino acid; urea; citric acid

褐藻胶是一种由多聚 D-甘露糖醛酸 $(\text{M})_n$ 和多聚 L-古罗糖醛酸 $(\text{G})_n$ 以一定规则排列组成的多

糖, 两者以交替的 $(\text{M})_n$ 、 $(\text{G})_n$ 或多聚交替 $(\text{MG})_n$ 相连接^[1]。随着海藻寡糖的生理作用不断被揭示, 褐

收稿日期: 2004-12-23; 修回日期: 2005-03-10.

基金项目: 国家 863 计划项目 (2003AA625030) 资助课题.

作者简介: 张香治 (1977-), 男, 内蒙古包头人, 微生物专业硕士研究生; * 通讯作者.

藻胶寡糖的活性引起了人们很大的兴趣.最近的研究表明,这些寡糖具有许多特殊的生理功能,例如促进双歧杆菌的生长、预防龋齿、抗真菌及细菌活性、抗肿瘤活性、免疫增强作用等.

目前用于降解褐藻胶多糖制备褐藻胶寡糖的方法主要有选择沉淀法、稀酸水解法、直接加热法和酶解法^[2],其中酶解法所用的酶多为从海产食藻动物如鲍鱼、海螺、海兔、海胆等的消化腺中提取的复合酶^[3].另外,也有利用海藻病烂处的细菌^[4]、海洋细菌、真菌发酵降解褐藻胶多糖,如弧菌(*Vibrio* sp. AL-9^[5]、*Vibrio* sp. AL-128^[6]、*Vibrio alginolyticus* AACC17749^[7])、黄杆菌(*Flavobacterium multivolum*^[8]、*Alginovibrio aquatilis*^[9])、固氮菌(*Azotobacter vinelandii*^[10])、克里伯氏菌(*Klebsiella aerogenes*^[11]、*Klebsiella pneumoniae*^[12])、假单胞菌(*Pseudomonas alginovora*, *Pseudomonas aeruginosa*^[13])、肠杆菌(*Enterobacter cloacae* M^[14])、别单胞菌(*Alteromonas* sp.^[15])、芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*^[16]、*Agarobacterium alginicum*^[17])等.

褐藻胶产量大、价格便宜,是发酵生产褐藻胶寡糖的优良原料.在利用 *Pseudoalteromonas elyakouii* 发酵生产褐藻胶寡糖的前期实验中使用的发酵培养基氮源为蛋白胨(成分同种子培养基),虽然使用此培养基发酵后的产物浓度较高,但因采用蛋白胨作氮源,其培养成本高因而利于工业应用.另外,发酵结束时,发酵液中残存的蛋白胨给分离纯化造成很大的困难.如使用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作培养基氮源,上述难题能很好的解决.但试验发现,当将发酵培养基中氮源换成无机氮源 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 时,菌不生长.在本研究中,作者希望寻找能使菌 *Pseudoalteromonas elyakouii* 在 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为惟一氮源的培养基中生长的关键性营养物质,另外,添加的物质应当成本低廉、成分简单.在寻找关键营养物质的过程中,作者并没有按照传统的方法,在氨基酸、有机酸、核酸 3 大类营养物质中寻找,而是通过对实验结果的分析,在代谢中间产物中寻找.

1 材料与方法

1.1 菌种

中国海洋大学食工系在青岛海带养殖厂病烂海带中分离获得,经鉴定为 *Pseudoalteromonas elyakouii*.

1.2 培养基数据

1.2.1 斜面培养基(组分 g/L) 琼脂 15, NaCl 20,低粘度褐藻酸钠(SA)(青岛海藻化工厂生产,食品级) 10, MgSO_4 3,蛋白胨 10. 采用 1 mol/L NaOH 溶液调 pH 7.2~7.4.

1.2.2 种子培养基(组分 g/L) NaCl 20, SA 10, MgSO_4 3,蛋白胨 10, Na_2HPO_4 1. 采用 1 mol/L NaOH 溶液调 pH 7.2~7.4.

1.2.3 基本培养基(组分 g/L) NaCl 20, SA 10, MgSO_4 3, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10, Na_2HPO_4 1. 采用 1 mol/L NaOH 溶液调 pH 7.2~7.4.

1.2.4 发酵培养基 由实验结果优化而成.

1.2.5 灭菌 培养基在 105 °C 湿热灭菌 20 min.

1.3 实验方法

1.3.1 菌种的保藏和活化 菌种在含 15% 甘油和 1% NaCl 的保种液中于 -80 °C 低温保存.活化时将保种液接种到含 50 mL 种子培养基的 250 mL 锥形瓶中,24 °C 恒温摇床培养 30 h 后活化.活化后的菌悬液涂平板,24 °C 恒温箱内培养 30 h,待用.

1.3.2 培养条件 斜面培养菌落挑取一接种环至种子培养基,24 °C 摇瓶振荡培养(转速 100 r/min) 20 h 后,取 1 mL 菌液接种到含有 100 mL 培养基的 500 mL 锥形瓶中,再于 24 °C 恒温摇床振荡培养,转速 100 r/min.

1.3.3 海带浸液的制备 10 g 干海带(海带分别采自胶州湾和宁波湾水域)加水煮沸 30 min,过滤除去残渣,滤液经减压蒸馏浓缩至 10 mL.

1.3.4 取样 接种 8 h 后每隔 4 h 从摇瓶中取样,取样量 1 mL,测量发酵产物褐藻胶寡糖的含量,直至褐藻胶寡糖不再增加为止.

1.3.5 发酵产物褐藻胶寡糖的测量 发酵液离心(10 000 r/min 离心 5 min),取上清液用蒸馏水稀释 60 倍,测量 235 nm 处吸光值(OD_{235}),空白对照为未接种的灭菌培养基,在相同的培养条件下培养,稀释后测量.

1.3.6 菌体生长量的测定 取 1 mL 发酵液用蒸馏水稀释 3 倍,测量 600 nm 处的吸光值(OD_{600}).

1.4 仪器

ZD-2 型自动电位滴定仪,无菌操作台, TGL-16G 台式离心机, 721 型分光光度计, 751 型分光光度计.

2 结果与讨论

2.1 种子生长曲线

由图 1 可以看出,种子的快速生长期在 8~20 h,接种时选取培养 20 h 的种子液,接种量 1%.

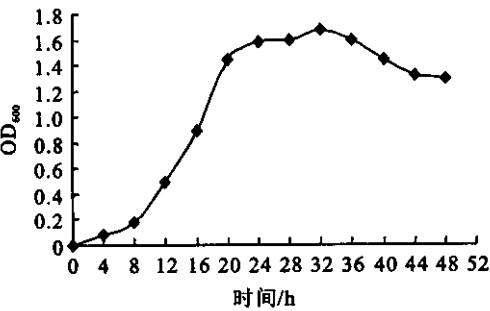


图 1 种子生长曲线
Fig. 1 The growth curve of the seed

2.2 海带浸液对发酵的影响

因为 *Pseudoalteromonas elyakouii* 是从海带里分离得到的,所以首先试验海带浸液添加在基本培养基中对发酵的影响.

将不同产地的海带制成的海带浸液加入到基本培养基中,制成含海带浸液的发酵培养基(100 mL 发酵培养基含 10 mL 海带浸液),发酵生产褐藻胶寡糖.表 1 为不同产地海带的海带浸液对发酵的影响.

表 1 不同产地的海带的海带浸液对发酵的影响
Tab.1 Effects of the kinds of seaweed extract in different places on the fermentation

海带浸液 种类	OD ₆₀₀	取样时间 1* / h	OD ₂₃₅	取样时间 2* / h
青岛产干海带	1.224	28	0.601	20
宁波产干海带	—	—	—	—

注:1. 取样时间 1,2 分别对应生物量(OD₆₀₀)和产物浓度(OD₂₃₅)达最大值的时间;2. “—”表示菌体在此培养基中不生长

从表 1 可看出,在添加了青岛产干海带的海带浸液的发酵培养基中发酵时,有较大的生物量和产物浓度.在添加宁波产干海带的海带浸液的发酵培养基内观察不到菌的生长现象.

由以上的结果可以看出,海带浸液虽然廉价,但因海带产地不同,制成的海带浸液发酵时的效果相差很大,这给今后的工业生产带来不稳定的因素.另外,海带浸液的成分复杂,这为下游的分离纯化造成不便.

2.3 葡萄糖和乳糖对发酵的影响

试验在基本培养基中添加葡萄糖和乳糖,培养条件不变,菌体不生长.

2.4 氨基酸对发酵的影响

加入质量浓度为 0.1 g/L 的几种氨基酸在基本培养基中,培养条件不变,氨基酸种类试验结果见表 2. 万方数据

表 2 不同种类氨基酸对发酵的影响 Tab.2 Effects of amino acids on the fermentation				
氨基酸	OD ₆₀₀	取样时间 1/ h	OD ₂₃₅	取样时间 2/ h
L-精氨酸	0.158	20	0.023	16
L-天冬氨酸	0.667	24	0.304	16
L-天冬酰胺	0.877	24	0.384	16
L-谷氨酸	1.632	28	0.264	12
L-谷氨酰胺	1.145	24	0.834	20
L,D-苯丙氨酸	—	—	—	—
L-脯氨酸	—	—	—	—
L-蛋氨酸	—	—	—	—
L-酪氨酸	—	—	—	—
L-亮氨酸	—	—	—	—
L-异亮氨酸	—	—	—	—

从表 2 的结果看出,L-天冬氨酸、L-天冬酰胺、L-谷氨酸、L-谷氨酰胺添加在基本培养基中对菌体生长有明显的促进作用.其中,添加 L-谷氨酸获得最大的生物量,OD₆₀₀ 为 1.632.添加 L-谷氨酰胺可获得最大的产物浓度,OD₂₃₅ 为 0.834.

只有很少几种氨基酸加入基本培养基中菌体才生长,加入谷氨酰胺时发酵液中的产物浓度最高;加入谷氨酸时发酵液中生物量虽然很大,但产物浓度不高.作者认为产物浓度不高的原因是:谷氨酸促使菌体大量生长,大量的菌体生长代谢时,消耗了降解生成的褐藻胶寡糖(褐藻胶是培养基中添加的惟一的碳源,降解产生的褐藻胶寡糖与未被降解的长链褐藻胶相比更容易被菌体利用),造成发酵液中产物浓度下降.与添加海带浸液的发酵培养基相比,加入谷氨酰胺的发酵培养基成分简单稳定,发酵后产物浓度高,并且有利于以后的分离纯化,但氨基酸的价格较高,培养基成本较高.

2.5 代谢中间产物的影响

上述试验中对菌体生长有明显促进作用的 L-天冬氨酸、L-天冬酰胺、L-谷氨酸、L-谷氨酰胺等均为氨基酸代谢的重要中间产物.因此,作者在微生物重要代谢过程(糖酵解、TCA 循环、乙醛酸循环、尿素循环)的中间产物中寻找能促进菌体生长的关键性营养物质.

将几种代谢中间产物,丙酮酸(糖酵解)、柠檬酸(TCA 循环)、延胡索酸(TCA 循环、乙醛酸循环)和尿素(尿素循环)添加到基本培养基中,添加物质质量浓度均为 0.1 g/L,结果见表 3.

表 3 丙酮酸、柠檬酸、延胡索酸、尿素对发酵的影响
Tab.3 Effects of pyruvic acid ,citric acid ,fumaric acid, urea on the fermentation

代谢中间产物	OD ₆₀₀	取样时间 1/ h	OD ₂₃₅	取样时间 2/ h
丙酮酸	—	—	—	—
柠檬酸	0. 871	20	0. 977	16
延胡索酸	—	—	—	—
尿素	0. 884	24	0. 820	16

由表 3 可看出,添加柠檬酸和尿素时菌体生长良好并且有较高的产物浓度,其中,添加柠檬酸时 OD₂₃₅ 为 0. 977,添加尿素时 OD₂₃₅ 为 0. 820. 试验合适的柠檬酸和尿素的添加质量浓度,结果见图 2.

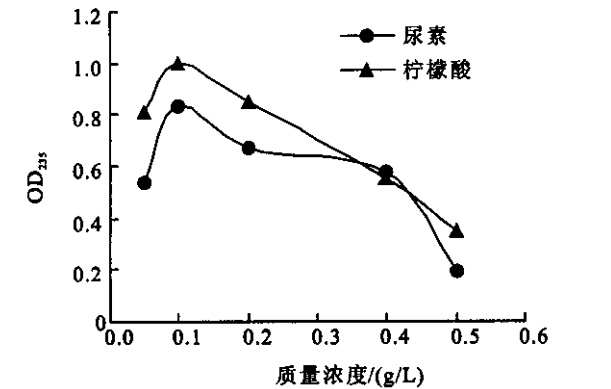


图 2 柠檬酸和尿素的质量浓度对发酵的影响
Fig. 2 Effect of citric acid and urea concentration on the fermentation

试验发现在基本培养基中分别加入质量浓度为 0.1 g/L 的柠檬酸和尿素时,发酵液产物浓度较大.

当在基本培养基中加入重要的代谢中间产物柠檬酸或尿素时,菌体生长良好,发酵后产物浓度高,并且培养基成分简单,价格低,利于工业生产.

几种效果好的添加物:谷氨酰氨、谷氨酸、柠檬酸和尿素,分别是氨基酸代谢、TCA 循环和尿素循环中的重要中间产物,这几种循环和它们的变形(如 TCA 循环的变形乙醛酸循环),广泛存在于细菌和真核生物的代谢过程中. 作者认为这几种物质在菌体生长初期起到诱导菌体生成代谢关键酶的作用,从而使菌体生长. 那些对菌体生长没有作用的添加物(部分的氨基酸、丙酮酸)可能不在菌体重要的代谢循环途径中,故无法诱导出供菌体生长的关键酶,所以菌体在含有上述添加物的培养基中不生长. 例如在添加葡萄糖时,菌体不生长,可能是因为海洋环境下,菌体进化出了一种利用褐藻胶作

碳源的代谢途径,取代了糖酵解途径,因此菌体内缺少代谢葡萄糖的酶. 另外柠檬酸、延胡索酸(延胡索酸同时也为乙醛酸循环的代谢中间产物)同为 TCA 循环的重要的代谢中间产物,但效果相差很大,可能是因为细菌细胞对两者的通透性不同所致,柠檬酸较容易进入细胞内.

2.6 新培养基性价比与蛋白胨作氮源的比较

比较几种培养基中 OD₂₃₅ 每提高 10 倍的培养基成本.

表 4 不同种类氮源及添加物性价比
Tab. 4 Comparing to the rate of effect/price of the mediums

培养基氮源及添加物	OD _{235 nm}	培养基成本/ (元/g)	性价比
蛋白胨	1. 417	0. 012 6	112. 46
海带+硫酸铵	1. 244	0. 002 6	478. 46
L-谷氨酰氨+硫酸铵	1. 11 4	0. 0046	242. 17
柠檬酸+硫酸铵	0. 871	0. 002 7	322. 59
尿素+硫酸铵	0. 884	0. 002 7	327. 41

由表 4 看出,无机氮源培养基大大地降低了培养基的成本,同时又大大地提高了性价比.

3 结 论

在利用 *Pseudoalteromonas elyakouii* 菌株发酵生产褐藻胶裂解产物褐藻胶寡糖的试验中,为了达到降低培养基成本和简化分离工艺的目的,使用 (NH₄)₂SO₄ 作为氮源的发酵培养基来代替蛋白胨作为氮源的发酵培养基,在 (NH₄)₂SO₄ 为氮源的基本培养基中,因营养物质缺乏,异养菌 *Pseudalteromonas elyakouii* 不生长,试验中在基本培养基中添加海带浸液、几种氨基酸、柠檬酸、尿素后使菌体生长产物生成. 本着成分简单,成本低廉的原则在以上添加物中选择两种,制成新的发酵培养基,分别是:基本培养基+1 g/L 柠檬酸和基本培养基+0.1 g/L 尿素.

在菌体代谢情况不明朗的情况下寻找能促进其生长的关键性营养物质,往往是在氨基酸、有机酸、核酸 3 大类营养物质中寻找^[18]. 而作者通过对添加氨基酸的试验结果的分析,提出了一种新颖的较为理性的寻找方法,即在代谢的重要中间产物中寻找促进菌体生长的关键性物质,这种方法在本试验中取得了较好的效果.

参考文献:

- [1] 陈政林. 褐藻胶[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1990.
- [2] 梁平方. 褐藻酸钠降解工艺的研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1995, 12(增刊): 216—221.
- [3] 朱仁华. 三种海螺解壁酶组分的比较研究[J]. 海洋学报, 1983, 5(增刊): 513—518.
- [4] 王艳玲, 唐学玺, 杨震. 褐藻胶降解菌产酶条件的研究[J]. 海洋科学, 2003, 27(2): 52—55.
- [5] Chao H T, Kuniko Y, Manabu K. Two types of alginate lyases from a marine bacterium *Vibrio sp.* AL-9[J]. **Nippon Suisan Gakkaishi**, 1992, 58(4): 743—749.
- [6] Chao HT, Kuniko Y, Manabu K. Isolation and some properties of alginate lyase from a marine bacterium *Vibrio sp.* AL-128[J]. **Nippon Suisan Gakkaishi**, 1992, 58(3): 53—538.
- [7] Manabu K, Kuniko Y. Method designed to detect alginate-degrading bacteria[J]. **Appl Envi Microb**, 1990, 56(9): 939—940.
- [8] Toshio T, Katsumi M, Isao K. A method for deployment of alginate using the enzyme system of *Flavobacterium multivolum*[J]. **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, 1994, 41(7): 505—511.
- [9] Gacesa P. Enzymic degradation of alginates[J]. **Int J Biochem**, 1992, 24: 545—552.
- [10] Davidson I W, Lawson C J. An alginate lyase from *Azotobacter vinelandii* phage[J]. **J General Microb**, 1977, 98: 223—229.
- [11] Jonathan B, James R. Isolation of a poly-2 α -2L-2gulluronatylase from *Klebsiella aerogenes*[J]. **Carbohydrate Research**, 1977, 57: 163—171.
- [12] Kstgaard, Knutsen S H, Dyrset N. Production and characterization of guluronate lyase from *Klebsiella pneumoniae* for applications in seaweed biotechnology[J]. **Enzyme Microb Technol**, 1993, 15(9): 756—763.
- [13] Min K H, Sasaki S F. Multiple components of endo-2-polyguluronidylase of *Pseudomonas sp*[J]. **J Biochem**, 1987, 81: 539—546.
- [14] Alfred L, Leigh R. Isolation and characterization of an alginase from mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. **J Bacteriology**, 1984, 159(3): 958—964.
- [15] Tomoko S, Shigeki Y, Isao K. Some properties and action mode of (1-4- α -L-guluronide) lyase from *Enterobacter cloacae* M-1[J]. **Carbohy Res**, 1999, 304: 125—132.
- [16] Jeffrey B H, Scott D, Ram J. Alginase enzyme production by *Bacillus circulans*[J]. **Appl Envi Microb**, 1984, 47(4): 704—709.
- [17] William A K, Eagon R G. Studies on the alginase of *Agarobacterium alginicum*[J]. **Can J Microbiol**, 1962, 8: 649—654.
- [18] 张克旭. 代谢控制发酵[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001. 69.

(责任编辑: 李春丽)

欢迎订阅 2005 年《冷饮与速冻食品工业》

《冷饮与速冻食品工业》杂志 是经国家新闻出版总署批准出版, 教育部主管, 江南大学(原无锡轻工大学)等单位主办, 面向国内外公开发行的国家级专业性技术指导类刊物, 是冷饮与速冻食品行业广大基层决策者、科研人员、生产者、经营者研发新品、寻求商机、开拓市场的良师益友。

《冷饮与速冻食品工业》杂志 及时报道国内外冷饮与速冻食品领域及其相关行业的科研成果、生产技术与市场动态, 通过邮局在全国各地发行, 影响广泛, 同时竭诚为我国冷饮与速冻食品行业的广大企业提供广告服务。广告内容涉及冷饮与速冻食品行业的新产品, 各种速冻、冷藏机械设备, 食品添加剂及原辅料等。

地 址: 江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, 江南大学蠡湖校区 31 号信箱《冷饮与速冻食品工业》杂志编辑部; 电话: 0510—5913521; 传真: 0510—5913521; 邮编: 214122; 电子邮件地址: csbfj@sytu.edu.cn。

联系人: 周晓黎 秦和平。