

根瘤菌 N613 胞外多糖发酵条件及抗肿瘤作用研究*

韩 勇 黄晓波 董岳峰 程红兵 赵良启**

(山西大学化学生物学与分子工程教育部重点实验室 太原 030006)

摘要 用摇瓶正交试验研究了根瘤菌 *Rhizobium* sp. N613 合成根瘤菌胞外多糖(rhizobium exopolysaccharide, REPS)的最佳培养基配方和最适培养条件。采用 10L 自动控制罐进行了分批发酵试验,获得了合成 REPS 的发酵动力学参数。经 40h 的补料分批发酵与代谢调控,REPS 产量达到 11.31g/L。此外,抗肿瘤实验表明,当 REPS 剂量为 5mg/kg 时,其抑瘤率可达 53.40%。结果表明,REPS 的发酵周期短,产量高,成本低,且具有良好的免疫活性与增稠性,有着极高的开发应用价值。

关键词 根瘤菌,胞外多糖,优化,发酵,抗肿瘤

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)05-0909-05

Studies on the Fermentation Conditions and Anti-tumor Effect of Exopolysaccharide from *Rhizobium* sp. N613*

HAN Yong HUANG Xiao-Bo DONG Yue-Feng CHENG Hong-Bing ZHAO Liang-Qi**

(Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Shanxi University Taiyuan 030006)

Abstract The potential of *Rhizobium* sp. N613 to produce the exopolysaccharide(REPS) was studied in this paper. Using an orthogonal design in a flask-shaker culture system, the fermentation medium and conditions of synthesizing REPS were optimized. Based on these results, the fermentation kinetic parameters were obtained in the batch fermentation with a 10L fermentor. The REPS yield of 11.31g/L was achieved by metabolic regulation during 40 h fed-batch fermentation. Transplanted tumor models of sarcoma 180 in mice were used to evaluate the anti-tumor effect. The result of anti-tumor activities showed that inhibition rate was 53.40%, when dose of REPS was 5mg/kg. These results indicate that REPS has the following properties: the short duration of fermentation, the high yield, the low cost, the effective immunocompetence and thickening. Thus, REPS has the value of development and application.

Key words :*Rhizobium* sp., Exopolysaccharide, Optimization, Fermentation, Anti-tumor

多糖是一类天然大分子物质,广泛存在于植物、动物和微生物中,参与能量转运、生殖受精、发育分化、免疫调节等生命活动过程^[1~3]。如今,越来越多的多糖产品被开发出来,并依据其性质和功能应用于各个领域。一些已作为添加剂、增稠剂、胶凝剂、水化剂等用于食品加工;一些作为润滑剂、絮凝剂、悬浮剂等用于石化生产;而另一些作为免疫功能增强剂用于医疗保健。

鉴于许多生物活性多糖具有调节人体生理功能与增强免疫力的作用,在抗癌与抗病毒病方面显示出了极大的潜力,活性多糖的研究已成为国内外

的热点课题。近 20 年来,人们对植物与真菌活性多糖^[4~6]进行了大量研究,并取得较大进展,然而对于细菌活性多糖的研究却较少。近来,我们获得一株锦鸡儿根瘤菌(*Rhizobium* sp. N613),能产生丰富的胞外多糖(REPS)。试验表明,该多糖具有良好的增稠性和免疫活性^[7],有望作为食品增稠剂和免疫功能增强剂。

本文研究了 *Rhizobium* sp. N613 合成 REPS 的培养基和培养条件,测试了其发酵动力学参数,并通过小鼠体内抑瘤试验研究了其抗肿瘤活性,为建立 REPS 的生产工艺及开发应用奠定了一定基础。

* 山西省自然科学基金资助项目(No. 2006011073),山西高校科技研究开发资助项目(No. 20051203)

** 通讯作者 Tel: 0351-7017151, E-mail: liangqi@sxu.edu.cn

收稿日期: 2006-12-19, 修回日期: 2007-04-17

1 材料与方法

1.1 菌种

Rhizobium sp. N613,从山西省五寨县境内锦鸡耳属植物根瘤上分离得到,已保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏号为 CCTCC M 205108。

1.2 培养基

1.2.1 斜面种子培养基(g/L):取新鲜豆芽 100 g,加自来水 1000 mL,煮沸约 30 min,纱布过滤,制备豆芽汁,再加入葡萄糖 10 g 和琼脂 25 g,煮沸,定容, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.2.2 摇瓶种子培养基(g/L):豆芽 100,葡萄糖 10。除不加琼脂外,制备方法同上,以 100mL 培养基/250mL 摇瓶分装。

1.2.3 发酵培养基(g/L):NaCl 0.1, H_3BO_3 0.002, Na_2MoO_4 0.002,其余组分参见培养基优化结果。淀粉经糖化酶降解制备淀粉水解液。豆饼粉水解液制备,参见文献[8]。

1.3 主要仪器设备

恒温振荡器,日立 CR22G 高速冷冻离心机,752N 紫外可见分光光度计,日立 U-2010 紫外分光光度计,10 L 自动控制发酵罐(镇江东方生物工程设备技术公司)。

1.4 种子培养

将 *Rhizobium* sp. N613 保藏种子接种至斜面种子培养基上,30℃ 培养 48 h。活化 2 次,将其接入摇瓶种子培养基,于 30℃,150r/min 摇床条件下培养 20h,作为 1 级摇瓶种子液。再以 10%(V/V)的接种量接种 2 级摇瓶,培养 20h 左右作为摇瓶正交试验与发酵罐试验的种子液。

1.5 培养基和培养条件的选择与优化

以 REPS 浓度为检验指标,选用 $L_{27}(3^{13})$ 正交表,第 1 次选择不同碳源、氮源、生长因子、pH 值、温度、溶氧为因子,第 2 次选择最佳碳源、氮源、生长因子及磷酸氢二钾和硫酸镁为因子,进行摇瓶试验及方差分析。综合两次摇瓶正交试验的结果确定最佳培养基配方与最适培养条件。

1.6 分批发酵

采用 10L 自动控制发酵罐,以优化后的发酵培养基和培养条件,进行分批发酵试验。装料系数 0.7,接种量 10%(V/V),通气量 7L/min,溶氧饱和度

控制在 10% 以上。每隔 2h 取样 1 次,测定生物量、碳源、氮源、磷酸盐和多糖浓度,绘制细胞生长、底物消耗及产物合成曲线,计算发酵动力学参数。

1.7 补料分批发酵

依据分批发酵的试验数据进行补料分批发酵,装料系数 0.6,其余基本条件同分批发酵。发酵过程分两阶段控制,第 1 阶段通过补加营养成分适当提高菌体浓度,第 2 阶段通过限制氮源、磷源、生长因子和补加碳源来提高 REPS 产量,以求达到 REPS 的高密度发酵。

1.8 REPS 的分离纯化

用蒸馏水稀释发酵液,6000 r/min 离心 20 min,上清液减压浓缩至发酵液原体积,用 3 倍体积 95% 乙醇沉淀,再以无水乙醇洗涤沉淀物 2 次,真空干燥后得粗多糖。将分离后所得的粗多糖制成 2g/L 的多糖水溶液,用 Sevag 法去除蛋白质,重复处理 3 次后,上清液用 3 倍体积的 95% 食用乙醇醇沉,沉淀物经真空干燥,得 REPS 纯品。

1.9 REPS 纯度检测

1.9.1 SephadexG-100 凝胶柱层析:将 REPS 纯品制成 2 g/L 的多糖水溶液,经过 SephadexG-100 凝胶柱(75 cm × 1.5 cm)层析,上样量 2mL,蒸馏水洗脱,流速为 6mL/h,分部收集,每管收集 2mL,以苯酚-硫酸法^[9]测多糖分布。

1.9.2 紫外光谱扫描:将 REPS 纯品制成 1g/L 的多糖水溶液,在 200nm ~ 400nm 进行紫外光谱扫描,检查是否存在核酸及蛋白质吸收峰。

1.10 REPS 对小鼠 S180 肉瘤的抑制作用

昆明种小鼠,体重(20 ± 2)g,购于山西医科大学实验动物中心。小鼠肉瘤细胞株(S180),购于北京协和药物所,本室以腹水型传代保种。

抽取接种 S180 细胞 8d ~ 10d 的小鼠腹水,用无菌生理盐水稀释成细胞数为 1×10^6 个/mL 的瘤细胞悬液,每只小鼠于右前肢腋皮下接种 0.2 mL。次日随机分组,每组 10 只,雌雄兼用且分养。以无菌水配制 REPS 溶液(REPS 浓度分别为 0.125 g/L、0.25 g/L、0.5 g/L、1.5 g/L、3 g/L 和 6 g/L,取不同浓度溶液依小鼠体重计算 ip 剂量),接种后 24 h 腹腔注射(ip)给药,荷瘤对照组 ip 生理盐水,阳性药对照组 ip 环磷酰胺(Cy),每日 1 次,每次 ip 0.4 mL,连续给药 10 d。于末次给药后 24 h,小鼠称重,处死小鼠,剥取瘤块并摘取脾脏和胸腺,称重,计算抑瘤

率、胸腺指数和脾指数^[10], 所得数据进行统计学处理(*t* 检验)。

肿瘤抑制率 % =

荷瘤对照组平均瘤重 - 实验组平均瘤重

荷瘤对照组平均瘤重

× 100%

1.11 检测方法

1.11.1 生物量 取发酵液 10 mL 用蒸馏水稀释后 , 6000 r/min 离心 20 min , 再以蒸馏水洗涤、离心菌体 3 次 , 80℃干燥至恒重后称重。

1.11.2 葡萄糖浓度 3, 5-二硝基水杨酸法。

1.11.3 硫酸铵浓度 改良靛酚蓝比色法^[11]。

1.11.4 磷酸盐浓度 钼蓝比色法^[12]。

1.11.5 REPS 浓度 : 将发酵液用蒸馏水稀释 , 6000 r/min 离心 20min , 上清液减压浓缩至发酵液原体积 , 用 3 倍体积 95% 乙醇沉淀 , 再以无水乙醇洗涤沉淀物 2 次 , 将沉淀物用蒸馏水重新溶解 , 苯酚-硫酸法测定多糖浓度。

2 结果与讨论

2.1 培养基和培养条件的选择与优化

Rhizobium sp. N613 是一株共生固氮菌 , 对其合成多糖的生物学特性了解甚少 , 故需进行培养基配方和培养条件的研究。参考相关资料^[13]并结合本室的研究经验 , 第 1 次正交试验因子和水平表头设计如表 1 , 且考察碳源与氮源的交互作用。摇瓶培养 24 h 后 , 检测 REPS 浓度并进行方差分析 , 结果见表 2。

表 1 第一次正交试验因子水平表

	A 碳源 (g/L)	B 氮源 (g/L)	C 生长因子 (g/L)	D pH	E 温度 (℃)	F 溶氧 培养液 mL/ 摇瓶 mL
1	葡萄糖 10	豆饼粉 3	无生长 因子	6.5	28	100/150
2	蔗糖 10	(NH ₄) ₂ SO ₄ 1.0	酵母粉 1.0	7.0	30	100/250
3	淀粉 10	蛋白胨 1.4	豆芽 200	7.5	32	100/500

依据试验结果 , 结合生产实际 , 确定最佳的培养基组合是 A1B2C3D2E2F2 , 即碳源为葡萄糖 , 氮源为硫酸铵 , 生长因子为豆芽汁 ; 通过直观分析结果确定最适 pH 值为 7.0 , 温度为 30℃ , 摇瓶培养基装量为 100 mL 培养基装入 250 mL 摇瓶。

第 2 次正交试验的表头设计见表 3 , 并考察葡

萄糖与硫酸铵 , 葡萄糖与豆芽汁 , 硫酸铵与豆芽汁的交互作用。摇瓶培养 24 h 后 , 依 REPS 浓度进行方差分析 , 结果见表 4。

表 2 第一次正交试验 REPS 浓度方差分析表

方差来源	平方和	自由度	均方和	<i>F</i> 值	显著性
A 碳源	0.597	2	0.299	229.615	* * *
B 氮源	0.012	2	0.006	4.615	* *
C 生长因子	0.014	2	0.007	5.385	* *
D pH	0.006	2	0.003	2.308	
E 温度	0.007	2	0.004	2.692	
F 溶氧	0.006	2	0.003	2.308	
A × B	0.014	4	0.004	2.692	*
误差	0.013	10	0.001		

*F*_{0.01}(2 , 10) = 7.56 , *F*_{0.05}(2 , 10) = 4.10 , *F*_{0.1}(2 , 10) = 2.92 , *F*_{0.1}(4 , 10) = 2.61

表 3 第二次正交试验因子水平表

	A 葡萄糖 (g/L)	B (NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	C 豆芽 (g/L)	D K ₂ HPO ₄ (g/L)	E MgSO ₄ · 7H ₂ O (g/L)
1	10	0.4	150	0.4	0.2
2	15	0.7	200	0.7	0.4
3	20	1.0	250	1.0	0.6

表 4 第二次正交试验 REPS 浓度方差分析表

方差来源	平方和	自由度	均方和	<i>F</i> 值	显著性
A 葡萄糖	0.772	2	0.386	90.824	* * *
B (NH ₄) ₂ SO ₄	0.020	2	0.010	2.353	
C 豆芽	0.539	2	0.270	63.412	* * *
D K ₂ HPO ₄	0.062	2	0.031	7.294	* *
E MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.105	2	0.053	12.353	* *
A × B	0.060	4	0.015	3.529	
A × C	0.135	4	0.034	7.941	* *
B × C	0.079	4	0.020	4.647	*
误差	0.017	4	0.004		

注 : *F*_{0.01}(2 , 4) = 18.00 , *F*_{0.05}(2 , 4) = 6.94 , *F*_{0.05}(4 , 4) = 6.39 , *F*_{0.1}(4 , 4) = 4.11

依表 4 方差分析结果确定的最佳组合为 A3B3C2D1E2 , 具体配方 (g/L) 为葡萄糖 20 , (NH₄)₂SO₄ 1.0 , 豆芽 200 , K₂HPO₄ 0.4 , MgSO₄ · 7H₂O 0.4 , 其余组分为 NaCl 0.1 , H₃BO₃ 0.002 , Na₂MoO₄ 0.002 , 采用上述优化的摇瓶发酵培养基和培养条

件进行 *Rhizobium* sp. N613 的摇瓶发酵, REPS 浓度稳定在 3.30 g/L 之上。考虑到发酵罐较摇瓶的溶质与溶氧传递速率好, 生物量与 REPS 会高出摇瓶, 需适当放大碳源、氮源量, 其发酵培养基 (g/L) 为葡萄糖 30 (NH_4)₂SO₄ 1.5, 其它成分同摇瓶发酵培养基。

2.2 分批发酵及动力学参数

分批发酵的试验结果见图 1。由分批发酵结果得知, 分批发酵的生物量最高为 7.471 g/L, 平均生长速率为 0.229 g/(L·h), 最大生长速率为 0.701 g/(L·h) 平均耗糖、耗氮和耗磷速率分别为 0.744 g/(L·h)、0.041 g/(L·h) 和 0.010 g/(L·h)。细胞对葡萄糖、硫酸铵和磷酸盐的得率系数分别为 0.314、5.707 和 23.059。REPS 对葡萄糖的得率系数为 0.345。REPS 最高产量为 8.21 g/L, 平均合成速率为 0.257 g/(L·h), 最大合成速率为 0.565 g/(L·h)。

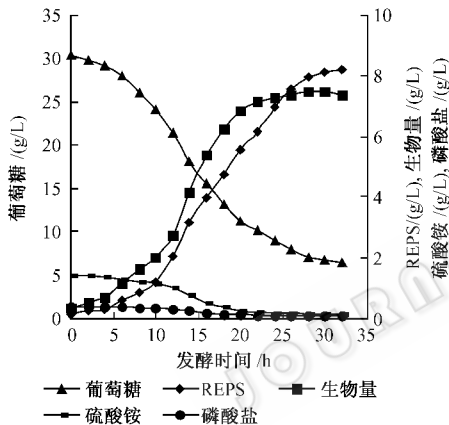


图 1 REPS 分批发酵

依照菌体细胞生长和产物 REPS 合成的关系, REPS 的合成属部分生长关联型。在对数期, 多糖产量会伴随着生物量的增加而增加, 而进入稳定期后, 大量合成的多糖只与细胞的总量有关。从分批发酵的结果尚可看出, 当氮、磷等营养物质浓度处于较低水平且碳源基质丰富时, 细胞生长速率减慢, 而多糖合成与积累速率加快。

2.3 补料分批发酵

参考分批发酵的相关参数, 采用细胞生长与多糖合成两阶段控制发酵。当细胞生物量达到 4 g/L 左右时, 开始启动多糖合成控制阶段。限制氮、磷浓度且补加碳源, 并控制溶氧、pH 等培养条件, 以提高 REPS 的产量。补料分批发酵的试验结果见图 2。在发酵过程中共计补糖 20 g/L, 生物量最高达

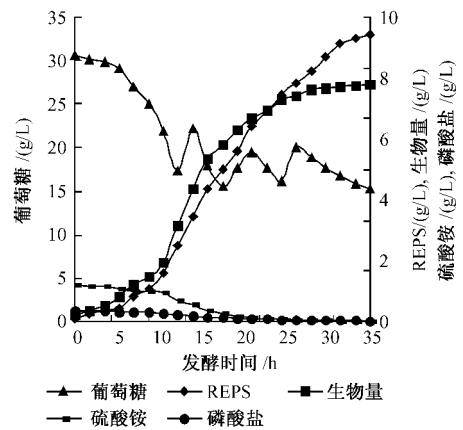


图 2 REPS 补料分批发酵

到 9.35 g/L, 平均生长速率为 0.234 g/(L·h), 最大生长速率为 0.73 g/(L·h); 平均耗糖速率 0.883 g/(L·h), 最大耗糖速率为 2.6 g/(L·h); REPS 产量达 11.31 g/L, 平均合成速率为 0.283 g/(L·h), 最大合成速率为 0.58 g/(L·h), 较分批发酵的 REPS 产量提高了 37.8%。

2.4 REPS 纯度检测

经过 Sevag 法去除蛋白质得到 REPS 纯品, 用苯酚-硫酸法测多糖纯度达 99% 以上。纯多糖为白色粉末, 溶于水, 不溶于甲醇、乙醇、丙酮等有机溶剂。将该多糖的水溶液经 Sephadex G-100 凝胶柱层析, 结果见图 3, 洗脱液呈单一对称峰, 说明多糖为均一组分。REPS 经紫外光谱检测, 在 260 nm 和 280 nm 处未见到核酸和蛋白质的吸收峰。

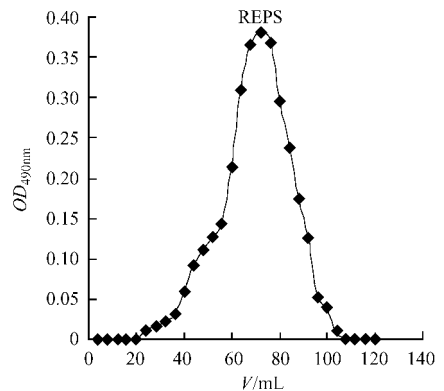


图 3 REPS 在 Sephadex G-100 上的色谱图

2.5 REPS 对小鼠 S180 肉瘤的影响

结果见表 5, REPS 各剂量组均能显著增加小鼠胸腺、脾脏的重量, 且对小鼠 S180 肉瘤均有抑制

表 5 REPS 对小鼠 S180 肉瘤及免疫器官的影响

组别	剂量(mg/g)	动物增重(g)	胸腺指数(mg/g)	脾指数(mg/g)	瘤重(g)	抑瘤率(%)
荷瘤组		7.71 ± 1.14	1.98 ± 0.10	5.32 ± 0.06	2.06 ± 0.16	
Cy 组	20	3.93 ± 0.52 *	0.55 ± 0.13 * *	3.86 ± 0.13 * *	0.73 ± 0.13	64.56 * *
REPS 组	2.5	7.34 ± 1.09	2.35 ± 0.21	6.36 ± 0.18	1.41 ± 0.09	31.55 *
	5	7.75 ± 1.11	2.73 ± 0.07 * *	7.41 ± 0.15 * *	0.96 ± 0.11	53.40 * *
	10	6.94 ± 1.26	2.29 ± 0.04 *	6.45 ± 0.15 *	1.23 ± 0.08	40.29 * *
	30	8.03 ± 1.20	2.21 ± 0.04	6.57 ± 0.20	1.39 ± 0.11	32.52 *
	60	7.16 ± 0.97	2.43 ± 0.06 *	7.85 ± 0.22 * *	1.26 ± 0.13	38.83 *
	120	7.68 ± 1.10	2.38 ± 0.05 *	7.36 ± 0.22 *	1.24 ± 0.09	39.81 * *

注 : * P < 0.05 , * * P < 0.01 与荷瘤对照组相比

作用 ,当 REPS 的剂量为 5 mg/kg 时 ,其抑瘤率可达 53.40%。另外 ,各剂量组均不明显影响小鼠的体重增加 ,说明 REPS 对小鼠无毒副作用。

2.6 讨论

上述试验结果表明 *Rhizobium* sp. N613 是一株兼性固氮、兼性好氧、嗜中性、中温型和快生型根瘤菌株。REPS 是该菌株的粘质层多糖 ,既是细胞组成成分 ,又是碳源与能源贮藏性物质。因此 ,在发酵过程中表现出了部分生长关联型的发酵特征。

该菌株的最大细胞生长速率为 0.73 g/(L·h) ,最大多糖合成速率为 0.58 g/(L·h) ,经限磷、限氮、补糖代谢调控 ,在 30 多个小时的发酵周期内 ,其 REPS 产量可达 10 g/L 以上。与现有的微生物活性多糖生产工艺相比 ,REPS 不仅发酵周期短 ,产量高 ,成本低 ,而且发酵过程中不产生色素、毒素等副产品 ,具有优良的生产性状。

前期实验结果已表明^[7] ,REPS 对小鼠的非特异性免疫、体液免疫和细胞免疫的功能均有明显的增强作用 ,本次实验又证明了 REPS 具有抗肿瘤活性 ,可见 REPS 能够很好地激发小鼠的免疫反应 ,其免疫机制仍需作进一步的研究。

综上所述 ,*Rhizobium* sp. N613 是一株极具开发

前景的生产菌株。其产物 REPS 有望作为增稠剂、免疫增强剂和抗肿瘤药物应用于食品与医药领域。

参考文献

[1] Leung M Y K , Liu C , Koon J C M , et al . Immunology Letters , 2006 , 105 : 101 ~ 114 .
[2] Tzianabos A O . Clin Microbiol Rev , 2000 , 13(4) : 523 ~ 533 .
[3] Weintraub A . Carbohydrate Research , 2003 , 338 : 2539 ~ 2547 .
[4] Schepetkin I A , Quinn M T . International Immunopharmacology , 2006 , 6 : 317 ~ 333 .
[5] Kardošová A , Machová E . Fitoterapia , 2006 , 77 : 367 ~ 373 .
[6] Wasser S P . Appl Microbiol Biotechnol , 2002 , 60 : 258 ~ 274 .
[7] 黄晓波 , 张建国 , 韩 勇 , 等 . 免疫学杂志 , 2006 , 22(3) : 149 ~ 150 , 154 .
[8] 赵良启 , 戚 敬 , 郝晋阳 . 生物工程学报 , 1998 , 14(4) : 395 ~ 400 .
[9] 张惟杰 . 糖复合物生化研究技术(第二版) . 杭州 : 浙江大学出版社 , 1999 . pp. 11 ~ 12 .
[10] 孙 震 , 陈石良 , 谷文英 , 等 . 药物生物技术 , 2001 , 8(5) : 279 ~ 283 .
[11] 赵良启 , 韩广业 . 山西大学学报 , 1999 , 22(3) : 265 ~ 269 .
[12] 李酉开 . 土壤农业化学常规分析方法 . 北京 : 科学出版社 , 1983 . pp. 382 ~ 383 .
[13] Guentas L , Pheulpin P , Michaud P , et al . Carbohydrate Research , 2001 , 332 : 167 ~ 173 .