

固定化衣藻细胞产生多糖的研究

杨廉婉

(中国科学院微生物研究所, 北京)

D. O. Hall

(英国伦敦皇家学院生物系)

藻类的种类多,在土壤和水域中分布广。开发藻类资源是引起广泛兴趣的领域。有些藻类能产生胞外多糖到周围的环境中。美国著名藻类学家 Lewin 报道了绿藻纯培养物产生的胞外多糖^[1]。近年来, Gudín等^[2], Thepenier等^[3]和 Hal等^[4, 5]。

报道了用固定化衣藻细胞产生胞外多糖的结果。关于衣藻产生胞外多糖的研究尚未见到报道。

多糖的用途很广,例如可用于食品、医药、土壤改良和石油工业等^[3, 6]。目前国内外有许多科学工作者和一些工厂从事多糖的研究和生产。

本文报道3株衣藻分别固定在聚氨基酸乙酸酯泡沫塑料上产生胞外多糖的适宜条件。

光照(60 μ mole photon)/m²/sec),在旋转摇床上(140rpm; 偏心距 2.5cm), 25 $^{\circ}$ C, 培养5—7天。所有的培养物供给5% CO₂-空气混合物。

自然细胞的培养: 20ml 种子培养物接种在150ml培养基中, 在25 $^{\circ}$ C 培养不同的时间, 取出分析胞外多糖的产量。

(三) 固定化细胞的制备

泡沫塑料74165A由英国Caliger 公司提供, 切成5mm³小块。把20ml 种子培养物接种在150ml含有150mg 泡沫塑料74165A 的培养基中, 25 $^{\circ}$ C生长5—7天。然后把固定化细胞从培养基中无菌操作取出, 用新鲜无菌生理盐水洗一次, 再放到150ml 新鲜培养基中继续培养。取不同培养时间的培养物分析胞外多糖的产量。

(四) 分析

用蒽酮法^[9]测定多糖。粘度用奥氏毛细管粘度计在30 $^{\circ}$ C测定。细胞在100 $^{\circ}$ C干燥24h称其干重。

材料和方法

(一) 藻种

墨西哥衣藻 (*C. mexicana*), 裸衣藻 (*C. gymnogama*) 和沙角衣藻 (*C. sajabo*) 由 Lewin 教授赠给。

(二) 培养基和培养条件

3株衣藻生长在琼脂斜面上, 组分为(%): 蛋白胨 0.1, KNO₃ 0.02, K₂HPO₄ 0.002, MgSO₄·7H₂O 0.002和琼脂1.0; 20 $^{\circ}$ C 培养1个月后悬浮在少量的无菌生理盐水中作为接种物。3株衣藻分别培养在 Lewin 培养基^[1]、高盐培养基^[7]、Allen培养基^[8]和M₁培养基(由西德哥亨根大学植物生理研究所提供)。在250ml三角瓶中含有150ml 培养基。用白色荧光灯连续

结果和讨论

(一) 产生多糖的适宜培养基

表1为实验结果。3株衣藻分别培养在4种培养基上, 25 $^{\circ}$ C培养16天之后, Lewin 培养基对 *C. mexicana*, 高盐培养对 *C. gymnogama* 和 Allen培养基对 *C. sajabo* 产生多糖是适宜的。

(二) pH的影响

本文于1987年7月17日收到。

本文的摘要曾发表在 *10th International Conference on Enzyme Engineering*, p. 215, 1985.

表 1 用固定化细胞产生多糖培养基的筛选

培养基	多 糖 (mg/ml)		
	<i>C. mexicana</i>	<i>C. gymno- gama</i>	<i>C. sajabo</i>
Lewin's	1.03	0.62	0.52
高 盐	0.33	0.76	0.56
Allen's	0.27	0.59	0.90
M12	0.72	0.56	0.76

*C. mexicana*产生多糖的最适pH是7.0(图1), 另两株衣藻产多糖的最适pH也是7.0(图略)。

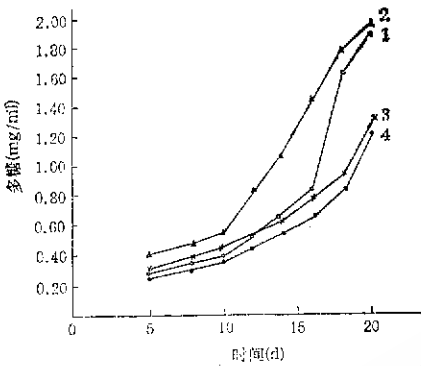


图 1 pH对*C. mexicana*胞外多糖产生的影响
1. pH6.0 2. pH7.0 3. pH8.0 4. pH9.0

(三) 含氮化合物的影响

含氮化合物对固定化细胞产生胞外多糖的影响, 结果见表2。把3株藻在25℃分别培养16天之后, 对*C. mexicana*和*C. gymnogama*最适合的氮源是Ca(NO₃)₂。对*C. sajabo*最适合的氮源是KNO₃。NH₄Cl不适合作为*C. gymnogama*和*C. sajabo*的氮源, 因为细胞的生长和多糖的产量直接受pH的影响。当固定化细胞培养在含有NH₄Cl的培养基中2天, 培养基的pH下降到5—5.5, 所用的培养基不能中和由于NH₄Cl的同化

表 2 不同的氮源对胞外多糖生产的影响

藻 种	多 糖 (mg/ml)			
	无氮	NH ₄ Cl	KNO ₃	Ca(NO ₃) ₂
<i>C. mexicana</i> *	0.26	2.18	0.96	2.30
<i>C. gymnogama</i> **	0.28	0.46	0.56	2.12
<i>C. sajabo</i> **	0.46	0.24	0.76	0.52

* 氮源浓度 2mmol/L

** 氮源浓度 5mmol/L

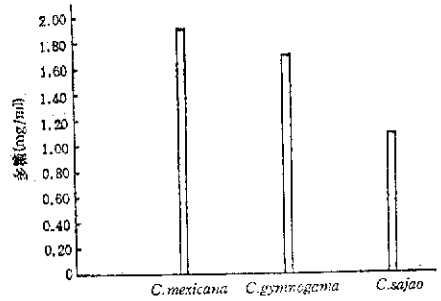


图 2 在pH6.5条件下, 三种衣藻固定化细胞产生多糖的比较

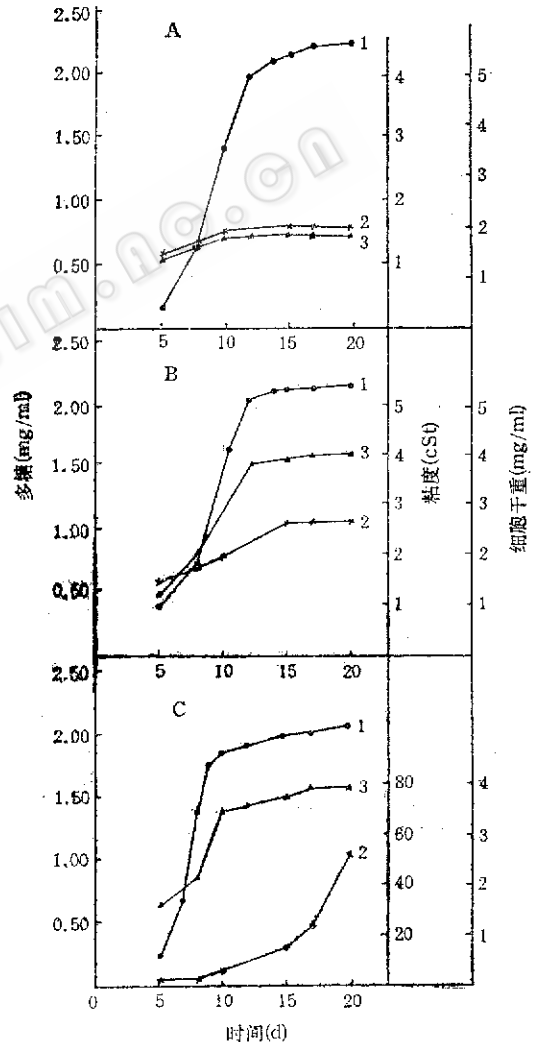


图 3 培养过程中胞外多糖、粘度和细胞干重的变化

A. *C. mexicana* B. *C. gymnogama* C. *C. sajabo*
1, 多糖 2, 粘度 3, 细胞干重

产生的过量氢离子。但是, NH_4Cl 对固定化 *C. mexicana* 细胞多糖的产量没有影响, 结果见图 2。多糖的产量为 1.90mg/ml , 高于其他两株衣藻。这表明该株衣藻具有一定的耐酸性。

(四) 培养过程中胞外多糖、粘度和细胞干重的变化

结果见图 3。多糖的产量依赖于固定化细胞的年龄和代谢活性。固定化 *C. gymnogama* 和 *C. sajao* 对多糖的产生随着衣藻细胞的干重增加

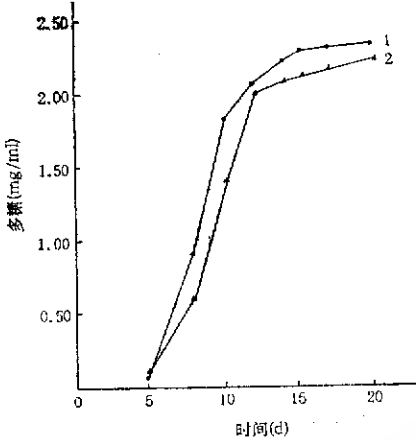


图 4 *C. mexicana* 自然细胞和固定化细胞产生胞外多糖的比较
1. 自然细胞 2. 固定化细胞

而增加。固定化 *C. mexicana* 细胞生产的多糖略高于上述两株衣藻, 但是多糖的粘度和细胞干重略低于上述两株衣藻。3 株衣藻产生较多多糖的时间是在培养 10—12 天之间。在培养 15 天之后, 细胞干重没有增加, 表明细胞进入生长的静止期。

(五) 自然细胞和固定化细胞胞外多糖生产的比较

在不同的培养时间, *C. mexicana* 固定化细胞产生多糖的量接近自然细胞的多糖产量 (图 4), 其余两株衣藻产生的多糖类似图 4 的结果 (图略)。在培养 20 天的培养物中, 3 株衣藻固定化细胞和自然细胞产生的胞外多糖 2mg/ml 以上。

结 论

3 株衣藻细胞固定在聚氨基甲酸酯泡沫塑料上与自然细胞比较, 它们的生长速度和多糖的产量都是相近的。因而, 从培养基中分离多糖和藻细胞的处理, 在一个含有固定化藻细胞的反应器中比用自然细胞较容易达到目的。因此, 设计一种用于多糖生产的生物反应器是适宜的。

参 考 文 献

- [1] Lewin, R.A. *Can. J. Microbiol.*, 2:665—672, 1956.
- [2] Gudin, C. et al.: *Proceedings of Biotech. 84 Europ.*, pp. 541—557, Online Publ. Ltd., Pinner, U. K., 1985.
- [3] Thepenier, C. and Gudin, C.: *Biomass*, 7:225—240, 1985.
- [4] Hall, D.O. et al.: *Plant Products and the New Technology*, 26:161—185, 1985.
- [5] Hall, D.O. et al.: *Photobiochemistry and Photobiophysics*, Suppl., p. 167—180, 1987.
- [6] Lewin, R.A.: *Cibaciao Transactions*, 3:31—35, 1977.
- [7] Starr, R.C.: *Supplement to J. Phycology*, 14:95—105, 1978.
- [8] Allen, M.B.: *Archiv. fur Mikrobiologie*, 24: 164—168, 1956.
- [9] Morris, D.: *Science*, 107:254—255, 1948.

STUDY ON PRODUCTION OF EXTRACELLULAR POLYSACCHARIDES BY IMMOBILIZED CELLS OF *CHLAMYDOMONAS*

Yang Lianwan

(Institute of microbiology, Academia Sinica, Beijing, China)

D. O. Hall

(Department of Biology, King's College London, UK)

This article deals with *Chlamydomonas mexicana*, *Chlamydomonas gymnogama* and *Chlamydomonas sajabo* immobilized in polyurethane foam for comparison of production of extracellular polysaccharides. Suitable conditions for extracellular production of polysaccharide by immobilized cells were investigated. The immobilized *C. mexicana*, *C. gymnogama* and *C. sajabo* cultured in Lewin's, high salt and Allen's media were optimal for polysaccharide production, respectively. The suitable nitrogen source for polysaccharide production was $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ for *C. mexicana* and *C. gymnogama*. KNO_3 was the best for *C. sajabo*. The optimal pH of the media was found to be 7.0 for polysaccharide production by all three *Chlamydomonas* species. The three immobilized *Chlamydomonas* species can produce about 2mg of polysaccharide/ml medium after 15—20 days at 25°C. The immobilized cells produced polysaccharide at a comparable rate to three living cells.