

文章编号 :1009-038X(2001)03-0223-05

pH 值对聚唾液酸分批发酵的影响及补料发酵

詹晓北, 郑志永, 朱莉, 吴剑荣

(无锡轻工大学生物工程学院, 江苏无锡 214036)

摘 要:研究了不同 pH 值对聚唾液酸发酵过程中菌体生长和产聚唾液酸的影响. 发酵初期 pH 自然下降时有利于菌体生长, 菌体生长对数期较长, 最大菌体干重可达 6.9 g/L; 发酵中后期 pH 控制在 6.4 时有利于聚唾液酸的延续合成, 合成对数期比其它 pH 条件下的合成对数期延长了 11 h. 动力学特性表现为部分相关模式, 而在其它 pH 条件下, 动力学特性表现为相关模式. 对聚唾液酸的流加补料发酵进行了初步研究, 最终使菌体干重达到 11.16 g/L, 聚唾液酸产量达到 2.606 g/L.

关键词:聚唾液酸; pH 控制; 分批发酵; 流加补料发酵

中图分类号: Q629.71

文献标识码: A

Effect of Different pH Controlled on Batch Fermentation of Polysialic Acid and Fed-batch Fermentation

ZHAN Xiao-bei, ZHENG Zhi-yong, ZHU Li, WU Jiang-rong

(School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036, China)

Abstract: The effect of different pH controlled during the process of batch fermentation on biomass and polysialic acid production with *Escherichia coli* K235-WXJ4 was investigated. It was showed that cultivation of the strain without controlled pH was advantageous to obtain high level of dry cell weight and lengthen the logarithmic phase. The period of polysialic acid production was prolonged when pH of the medium was set at 6.4 during the stationary phase, and the specific rate of polysialic acid was higher than that of the pH set at other point, showing the partial correlative kinetic model characteristic. The fed-batch fermentation of polysialic acid was preliminarily studied, and the dry cell weight and the yield of polysialic acid reached 11.16 g/L and 2.606 g/L, respectively.

Key words: polysialic acid; pH controlled; batch fermentation; fed-batch fermentation

唾液酸(5-氨基-3,5-二脱氧-D-丙三氧基-D-半乳-壬酮糖酸)是一族神经氨酸的衍生物^[1],广泛存在于糖蛋白和糖脂的末端,在许多与糖和蛋白相互作用有关的生理过程中起着很重要的作用^[2],唾液酸及其衍生物在治疗流感、神经性疾病、炎症、肿瘤等方面有很重要的应用价值^[3].聚唾液酸是由 N-乙

酰神经氨酸或 N-羟乙酰神经氨酸以 α -2,8、 α -2,9 或 α -2,8/ α -2,9 酮苷键连接的直链分子.聚唾液酸经酸或酶水解后即可得到唾液酸单体.唾液酸的生产方法主要有微生物发酵法^[4]、抽提法^[5]、酶法合成等^[6].

随着唾液酸的需求量的不断增长,国外进行了

收稿日期 2000-12-26,修订日期 2001-03-26.

基金项目 江苏省自然科学基金项目(BK99190)资助课题.

作者简介 詹晓北(1962-),男,福建浦城人,工学硕士,副教授.

一些唾液酸工业化生产的研究.1991 年 ,Lekh Raj Juneja 等从禽蛋中的蛋黄膜和系带中大量提取唾液酸^[7] 美国也报道了从牛乳乳清和酪蛋白中提取唾液酸^[5,8].我国在这一方面起步较晚 ,目前国内研究主要集中在微生物发酵的菌体筛选和培养基优化方面^[9,10] ,关于控制发酵和补料发酵的研究尚未见报道.作者通过研究 pH 值对分批发酵的影响 ,在此基础上进行流加补料发酵 ,产聚唾液酸能力达到 2.606 g/L ,为实现唾液酸的工业化生产创造了条件.

1 材料与方法

1.1 菌种和培养基

1.1.1 菌株 大肠杆菌(*Escherichia coli*)K235-WXJ4 作者所在研究室保藏.

1.1.2 种子培养基(g/L) NaCl 5 ,胰蛋白胨 10 ,牛肉膏 5 ,pH 7.2 ~ 7.4.

1.1.3 分批发酵培养基(g/L) 固体山梨醇 30 ,NH₄Cl 5 ,胰蛋白胨 0.4 ,K₂HPO₄·3H₂O 20 ,pH 7.1 ~ 7.2 (灭菌后).

1.1.4 流加补料发酵基础培养基(g/L) 固体山梨醇 20 ,NH₄Cl 3.6 ,其它成分同分批发酵培养基.

1.1.5 流加液(g/L) 固体山梨醇 583 ,氯化铵 108.

1.2 设备与试剂

1.2.1 发酵罐 15 L 全自动发酵罐(Biostat C10-3) 德国 B. Braun 公司生产.

1.2.2 试剂 唾液酸标准品 Pfanstiehl Lab Inc 赠送 ,固体山梨醇(食品级) 东莞市嘉蜜宝糖业有限公司生产 ,其它为市售分析纯试剂.

1.3 方法

1.3.1 种子培养 接一环生长良好的斜面培养物至装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中培

养 ,摇瓶转速为 250 r/min ,温度 37 ℃ 培养 12 h.

1.3.2 15 L 培养 15 L 的发酵罐装液量为 9 L ,接种量 4 % ,发酵温度 37 ℃ ,搅拌转速 400 r/min ,通气量 1 L/(L·min) ,培养 40 h. 灭菌前加入少量泡敌以控制发酵过程中的泡沫.

1.3.3 菌体干重测定 取 10 mL 发酵液 ,加入 1 mL 1 mol/L HCl ,混匀 ,4 000 r/min 离心 15 min ,去离子水水洗 2 次 ,将菌泥转移至铝皿中 ,80 ℃ 干燥至恒重.

1.3.4 聚唾液酸测定 间苯二酚-盐酸法^[11].

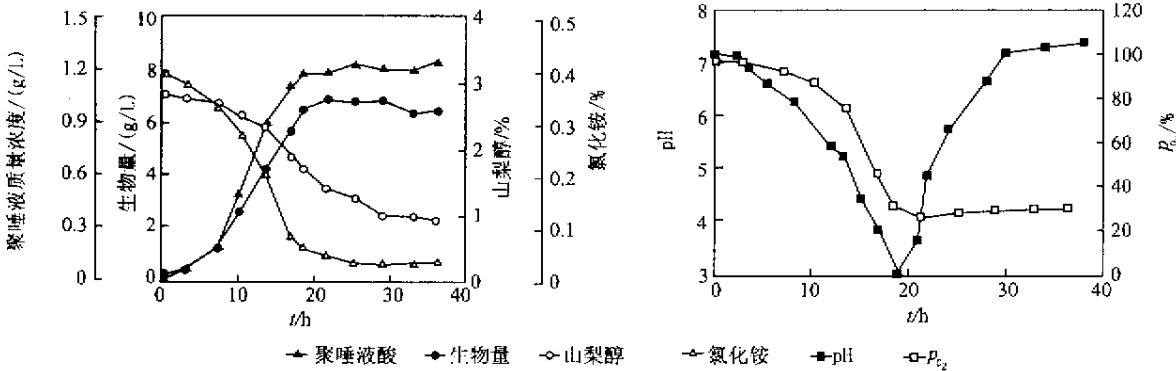
1.3.5 山梨醇测定 高碘酸-变色酸法^[12].

1.3.6 氯化铵测定 纳氏比色法^[13].

2 结果与讨论

2.1 代谢过程分析

图 1 是液体培养 *E. coli* K235-WXJ4 的代谢过程曲线 ,给出了菌体干重 ,聚唾液酸质量浓度 ,山梨醇质量分数 ,氯化铵质量分数 ,pH ,*p*_{O₂} 6 个参数的变化情况.从图中可见 ,生物量和聚唾液酸质量浓度同步增加 ,产物的合成与细菌的生长是相关的过程.延滞期后 ,氯化铵被加速利用 ,18 h 后氯化铵质量分数下降至 0.04 % ,菌体生长进入稳定期 ,菌体干重达到 6.9 g/L ,聚唾液酸质量浓度达到最高值 1.230 g/L ,此时发酵液中的山梨醇质量分数仍有 1.4 % 左右.随后山梨醇质量分数继续下降 ,而氯化铵质量分数趋于平缓并处于很低的水平.由于铵离子作为氮源被菌体利用而释放出质子 ,和发酵过程中产生有机酸 ,培养液中的 pH 在菌体生长进入对数期后迅速下降 ,当 pH 低于 5.0 时 ,由于细胞内某些与聚唾液酸合成有关的酶受到抑制 ,不利于细胞合成聚唾液酸^[14].溶氧在 19 h 内迅速下降并降至零点 ,之后由于菌体生长进入稳定期而对氧的需求量减少 ,*p*_{O₂} 又始回升.



万方数据

图 1 聚唾液酸分批发酵过程

Fig.1 Course of batch fermentation of polysialic acid

2.2 控制 pH 值对分批发酵的影响

发酵培养液的 pH 值影响菌对基质的利用速度、细胞结构以及细胞内各种酶的活性,从而影响菌体的生长和产物的合成^[15]。由于发酵是多酶复合反应系统,各酶的最适 pH 值也不相同,因此,同一菌种,生长最适 pH 值可能与产物合成的最适 pH 值是不一样的。

作者已研究了不同起始 pH 值对聚唾液酸合成的影响^[16],发现低起始 pH 值和高起始 pH 值均不利于聚唾液酸的合成,而起始 pH 值为 7.1(灭菌后)时菌体生长旺盛,延滞期较短,聚唾液酸产量较高。为了解在发酵过程中 pH 值对菌体生长和聚唾液酸合成的影响,作者采用先使菌体在起始 pH 值为 7.1

的条件下生长,pH 值自然下降至一定值后,自动流加 30 % NaOH 使培养液的 pH 恒定在某值,以考察发酵中后期培养液的 pH 值对分批发酵的影响。

2.2.1 pH 值对产物合成模式的影响 图 2 是发酵中后期控制不同 pH 值对 *E. coli* K235-WXJ4 发酵生产聚唾液酸的过程曲线。从图中可以发现:控制不同的 pH 值,其产酸模式不同,在发酵中后期 pH 恒定在 6.4 时,18 h 后菌体生长进入稳定期,聚唾液酸继续合成至 33 h,表现为延续合成型,而在其它 pH 条件下,聚唾液酸的合成与菌体生长同步进行,即当细胞生长进入平衡期后,聚唾液酸合成随即停止。

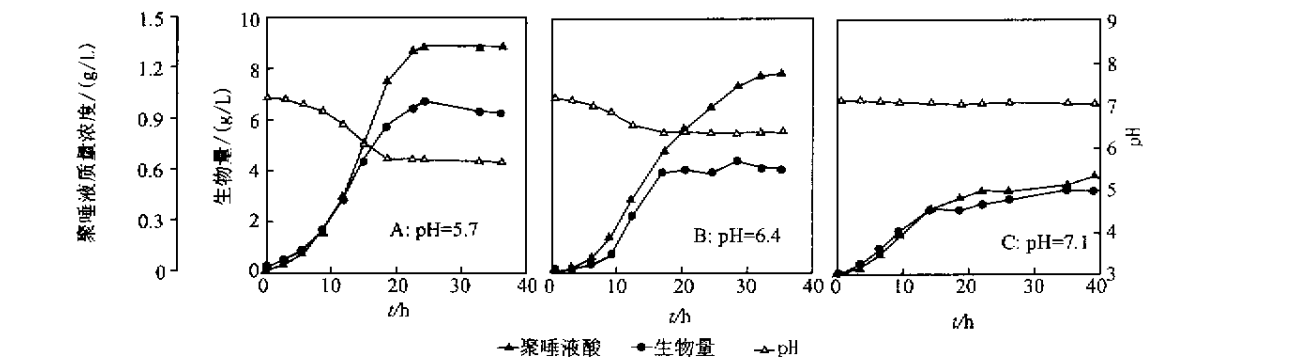


图 2 控制不同 pH 对分批发酵的影响

Fig.2 Effect of different pH controlled on batch fermentation of polysialic acid

2.2.2 pH 值对细胞生长和聚唾液酸合成的影响

聚唾液酸是 *E. coli* K235-WXJ4 的胞外多糖,没有一定量的细胞就不可能使聚唾液酸达到一定的水平。表 1 比较了控制不同 pH 条件下菌体细胞生产强度、聚唾液酸生产强度、产物对菌体的得率系数等发酵过程指标。比较图 1、图 2 和表 1 可看出,不同 pH 条件会影响菌体生长对数期的长短,当发酵中后期 pH 恒定在 5.7 时或 pH 自然下降时,菌体生长对数期为 23 h 左右,而 pH 恒定在 6.4 或 7.1 时,对数生长期减短;前者最终得到的菌体干重达到 6.77 g/L 和 6.90 g/L,生产强度达到 0.279 g/(L·h)和 0.321 g/(L·h),远远高于其它 pH 条件下的生产强度。

从图 2 可看出,当发酵中后期 pH 控制在 6.4 时,菌体生长停止后,聚唾液酸浓度继续上升,使得聚唾液酸合成的时间得到明显延长。从表 1 可看出,发酵中后期 pH 控制在 6.4 时,尽管聚唾液酸的生产强度不及前二者,但产物对细胞的得率系数最大,这可能是由于在 pH 为 6.4 时,有利于提高胞内与聚唾液酸合成有关酶的活力,从而影响到聚唾液酸直链分子的聚合度^[14]。

从前面的研究结果可知,发酵前期 pH 自然下降有利于菌体的生长,菌体活力高,聚唾液酸产量随之升高,在菌体生长进入稳定期后,可调节培养液的 pH 值,使之恒定在 6.4,可进一步促进聚唾液酸的合成,提高发酵水平。

表 1 控制不同 pH 条件对聚唾液酸发酵结果的影响

Tab.1 Effect of different pH controlled on batch fermentation of polysialic acid

pH 控制方式	菌体干重/(g/L)	聚唾液酸质量浓度/(mg/L)	菌体生产强度/(g/(L·h))	聚唾液酸生产强度/(mg/(L·h))	细胞产物得率/ $Y_{P/X}$
自然下降	6.90	1 230	0.321	48.71	0.178
恒定 5.7	6.77	1 337	0.279	55.13	0.197
恒定 6.4	4.50	1 187	0.158	33.44	0.264
恒定 7.1	4.50	579	0.0963	14.85	0.175

2.3 流加补料发酵

2.3.1 选择流加补料发酵的依据

在分批发酵研究中发现,聚唾液酸的积累与菌体量的增加是相关的,聚唾液酸的增长随着菌体生长而增加.在底物消耗过程中,氯化铵比山梨醇更早地耗尽,成为菌体进一步生长的限制条件,这种情况表明只要继续供给足够的碳、氮源,微生物细胞仍然有能力再增殖和合成聚唾液酸,采用流加补料的发酵方式可提高聚唾液酸的产量和生产效率.

根据分批发酵进程曲线(图1),选择菌体生长进入对数期中期(12 h)时,开始流加补料液,由于生物量的提高需要氮源的供给,合成的产物聚唾液酸需要氮元素等原因,因此在补入碳源的同时应补入相应含量的氮源.

2.3.2 流加补料方式的比较

在培养基、发酵条件、补料液组成等基本相同的条件下,采用不同流加方式进行补料发酵.

间歇定量流加:发酵到12 h后,每间隔6 h,每次流加100 mL补料液,共流加3次.pH降至5.5以下后补入30% NaOH溶液使培养液pH值恒定在6.4.

连续恒速流加:在分批发酵过程中,测得的氯化铵的消耗速率为198 mg/(L·h).在发酵到12 h

时开始按此速度流加补料液,流加18 h.pH降至5.5以下后补入30% NaOH溶液使培养液pH恒定在6.4.其结果列于表2.

在2种流加方式中,间歇定量流加发酵的残余山梨醇低于连续恒速流加,流加方式对菌体生长和聚唾液酸合成有较明显的影响,连续恒速流加的菌体干重和聚唾液酸产量比间歇定量流加分别提高了25.3%和31.6%.连续恒速流加的 $Y_{P/S}$ 高于间歇定量流加,但二者的 $Y_{P/X}$ 相差不大,这说明连续恒速流加能使底物水平保持在一个相对比较合适的范围内,促进了菌体的生长和聚唾液酸的合成.

从图3可看出,在聚唾液酸连续恒速补料发酵过程中,9 h后菌体生长进入对数期,菌体干重迅速上升,24 h后菌体干重和聚唾液酸生成速率趋于缓慢,35 h菌体生长停止,聚唾液酸质量浓度也不再上升.12 h后氯化铵消耗很快,尽管此时开始恒速流加氯化铵,但氯化铵的质量浓度仍急剧下降,27 h后由于补入的氯化铵量大于菌体所消耗的量,故氯化铵的质量浓度开始回升.以上说明氯化铵和山梨醇的流加能促进菌体的生长聚唾液酸的延续合成,发酵达到了较高水平,菌体干重达到11.16 g/L,聚唾液酸浓度达到2.606 g/L.比不补料的分批发酵提高了112%.

表 2 流加方式对发酵的影响

Tab.2 Effect of feed model on fermentation of polysialic acid

流加方式	基础培养基中山梨醇质量浓度/(g/L)	基础培养基中氯化铵质量浓度/(g/L)	补入山梨醇总质量/g	补入氯化铵总质量/g	残余山梨醇质量浓度/(g/L)	残余氯化铵质量浓度/(g/L)	菌体干重/(g/L)	聚唾液酸质量浓度/(mg/L)	山梨醇产物得率/ $Y_{P/S}$	细胞产物得率/ $Y_{P/X}$
间歇定量	20	3.56	175	32.4	4.43	1.02	8.91	1 980	0.0502	0.222
量流加	20	3.61	175	32.4	4.39	1.05	9.36	2 020	0.0512	0.216
连续恒速流加	21	3.64	175	32.4	5.13	0.84	11.16	2 606	0.0644	0.233

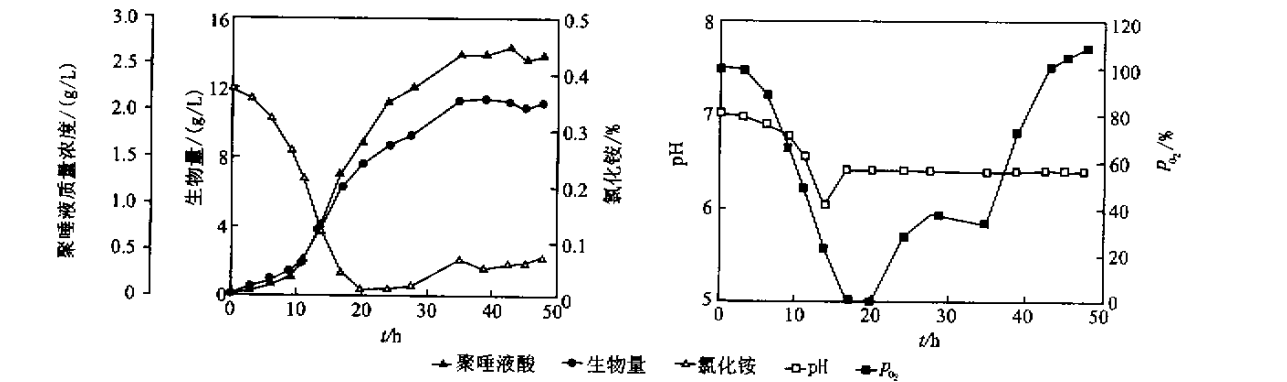


图 3 连续恒速流加发酵过程曲线

Fig.3 Course of fed-batch fermentation of polysialic acid

参考文献：

[1] BLIX G , GOTTSCHARLK A , KLENK E. Proposed nomenclature in the field of neuraminic and sialic acid[J]. **Nature** , 1957 , 179 :1088 ~ 1092.

[2] SHEN Gwo-jenn , DATTA A K , MASAYUKI Izumi , *et al.* Expression of α -2 9/ α -2 8-Polysialyltransferase from Escherichia coli K9[J]. **J Biol Chem** , 1999 , 274(49) : 35139 ~ 33146.

[3] ZBIGNIEW J , KARL A. Carbohydrate in drugs design[M]. New York : Marcel Dekker , 1997.

[4] YOSHIHIRO Uchida , YOJI Tsukada. Improved microbial production of colominic acid , a homopolymer of N-acetylneuraminic acid[J]. **Agr Biol Chem** , 1973 , 37(9) : 2105 ~ 2110.

[5] Koketsu. Methods for production of sialic acid[P]. 美国专利 :USP 5223033 , 1993-08-03.

[6] JENNIFER , LIU Lin-chun. Overproduction of CMP-sialic synthetase for organic synthesis[J]. **J Am Chem Soc** , 1992 , 114 : 3901 ~ 3910.

[7] LEKH J , MAMORU K. Large-scale preparation of sialic acid from chalaza and egg-yolk membran[J]. **Carbohydrate re-search** , 1991 , 214 : 179 ~ 186.

[8] Masskarn Shimatanl. Process for manufacturing sialic acids-containing composition[P]. 美国专利 :USP 5270462 , 1993-12-14.

[9] 郭良栋 , 钱世钧 , 叶军等. 产多聚唾液酸的菌种筛选及产酸条件[J]. 微生物学报 , 1998 , 38(2) : 103 ~ 107.

[10] 贾薇 , 詹晓北. 高产聚唾液酸产生菌的诱变育种及培养条件确定[J]. 无锡轻工大学学报 , 1999 , 18(6) : 134 ~ 137.

[11] SVENNERHOLM L. Quantitative estimation of sialic acid[J]. **Biochim Biophys ACTA** , 1957 , 24 : 604 ~ 611.

[12] PESEZ M , BARTOS J. Colorimetric and fluorimetric analysis of organic compounds and drugs[M]. New York : Marcel Dekker , 1974.

[13] 张宏陶. 生活饮用水标准检验法方法注解[M]. 重庆 : 重庆大学出版社 , 1993.

[14] RODRIGUEZ-APARICIO L B , REGLERO A , ORTIZ A I , *et al.* Effect of physical and chemical conditions on the production of colominic acid by Escherichia coli in a defined medium[J]. **Applied Microbiology Biotechnology** , 1988 , 27 : 474 ~ 483.

[15] 熊宗贵. 发酵工艺原理[M]. 北京 : 中国医药科技出版社 , 1995.

[16] 贾薇. 聚唾液酸生产菌的诱变育种及发酵研究[D]. 无锡 : 无锡轻工大学 , 2000.

(责任编辑 朱 明)

启 事

经教育部批准 , 无锡轻工大学、江南学院、无锡教育学院于 2001 年 2 月 13 日合并成立江南大学。对于本校作者在本刊发表的论文 , 2001 年 2 月 12 日及其以前所投稿件 , 刊登时署并校前原单位名称 ; 2001 年 2 月 13 日及其以后所投稿件 , 刊登时一律署江南大学。

特此说明。

《无锡轻工大学学报》编辑室
2001 年 5 月 30 日