文章编号：1009－038X(2002)06－0583－05

聚唾液酸的摇瓶工艺

于军华， 詹晓北， 朱 莉， 李新春， 朱一晖
(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214036)

摘 要：研究了突变株 JYL-11(*Escherichia coli*)的摇瓶发酵工艺条件：在山梨醇 40 g/L，K_2HPO_4 20 g/L，NH_4Cl 4 g/L，$MgSO_4$ 0.9 g/L，蛋白胨 1.5 g/L，起始 pH 值 7.8，装液量 35 mL(250 mL 的三角瓶中)，转速 250 r/min，培养温度 37 ℃，接种量为 4%(体积分数)的条件下，聚唾液酸产量达到 3.5 mg/mL，比优化前提高了 1.0 mg/mL，提高幅度为 40%.

关键词：聚唾液酸；摇瓶发酵；方差分析
中图分类号：Q 538　　**文献标识码**：A

The Conditions for Fermentation of Polysialic Acid in Shaking Flask

YU Jun-hua， ZHAN Xiao-bei， ZHU Li， LI Xin-chun， ZHU Yi-hui
(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: With a mutation *Escherichia coli* WX-JYL11, the optimal medium and culture condition for polysialic acid production was investigated by using shaking flask. The optimal medium was establish as follow: sorbitol 40 g/L; K_2HPO_4 20 g/L; NH_4CL 4 g/L; $MgSO_4$ 0.9 g/L; Tryptone 1.5 g/L. The optimal culture condition were that: initial pH 7.8; volume 35 mL/250 mL; shaking speed 250 r/min; temperature 37 ℃. With this medium, the production of polysialic acid was 3.5 mg/mL, increased by 40% under optimized conditions.

Key words: polysialic acid; shaking flask fermentation; analysis of variance

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]，唾液酸及其衍生物在治疗流感、炎症、肿瘤等方面有一定的应用价值[2]. 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 糖苷键或 α-2,8/α-2,9糖苷键连接的直链分子[3]. 聚唾液酸经酸或酶水解后即可得到唾液酸单体. 随着人们对唾液酸的需求量的不断增长，唾液酸的产量已经成为限制其应用的主要因素.

作者所在实验室保存的 *E. coli*-K235 菌株经过了紫外、^{60}Co，以及亚硝基胍、低能离子注入和硫酸二乙酯的连续处理后[4]，得到的高产突变株在培养条件和培养基成分的需求上都和出发菌株有不同的地方，为此作者探讨了其最优的培养基配方和摇瓶发酵条件.

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-WXJYL11 为作者所在研究室保藏.

收稿日期：2002－06－26； 修订日期：2002－09－30.
基金项目：江苏省自然科学基金项目(BK99190)资助课题.
作者简介：方数华(1977－)，男，山西昔阳人，发酵工程硕士研究生.

1.1.2 种子培养基 组分(g/L):NaCl 5,胰蛋白胨 10,牛肉膏 5;pH 7.0 ~ 7.2.

1.1.3 斜面培养基 种子培养基中加入琼脂 15~20 g/L.

1.1.4 发酵培养基 组分(g/L):固体山梨醇 30,NH_4Cl 6,胰蛋白胨 1.0,$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 22,$MgSO_4$ 0.6;pH 7.5 ~7.8(所有的培养基优化都在此基础上改变).

1.2 方法

1.2.1 斜面培养 将保存的斜面菌种,接一环到新鲜的斜面培养基上,37 ℃,培养 12 h.

1.2.2 一级种子的制备 接长好的斜面菌种到装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 的三角瓶中,37 ℃,220 r/min,培养 12 h.

1.2.3 摇瓶发酵 在无菌条件下吸取 1.6 mL 种子液,加到装有 40 mL 培养液的 250 mL 的三角瓶中,37 ℃,220 r/min,培养 58 h.

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

1.2.5 聚唾液酸测定 间苯二酚-盐酸法[5].

2 结果与讨论

2.1 不同碳源浓度对聚唾液酸产量的影响

碳源不仅可作为菌体生长的能源而且是合成产物的原料.合适的碳源质量浓度不仅能提供菌体代谢所需的能源,而且能使菌体最大规模地合成所需要的产物.为了提高突变株的聚唾液酸产量,选择不同山梨醇质量浓度进行实验,结果见图 1.

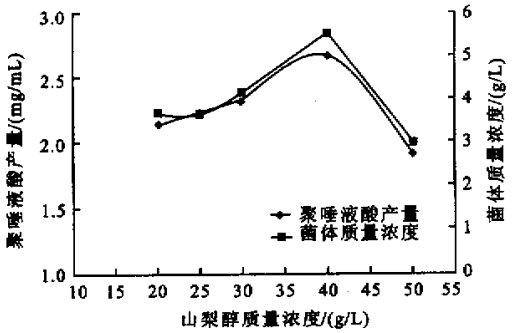

图 1 山梨醇质量浓度对聚唾液酸产量的影响

Fig. 1 Effect of sorbitol concentration on yield of polysialic acid

在不同的山梨醇质量浓度下,聚唾液酸的质量浓度呈现先升后降的趋势.山梨醇质量浓度从 20 g/L 增加到 40 g/L 时,虽然聚唾液酸的产量增幅不大,但说明发酵过程中碳源质量浓度低于 40 g/L 时,菌体的生长没有受到抑制,聚唾液酸的产量和生物量均达到最大值.因此选择 40 g/L 作为最佳的碳源质量浓度进行进一步的优化实验.

2.2 正交实验

2.2.1 因素水平 发酵后期 pH 值对聚唾液酸的产量影响较大[6].在发酵过程中影响 pH 值变化的因素主要有氮源和磷酸盐,而起始 pH 值的高低对菌体的正常生长和最终发酵液的 pH 值也有较大的影响,所以设计起始 pH 值、氮源和磷酸盐为三因素,进行三水平的正交实验.为了考虑各因素间的交互作用,采用正交表 $L_{27}(3^{13})$.不同因素的水平见表 1.

表 1 因素的水平

Tab.1 Variables and levels

水平	起始 pH 值 A	氯化铵质量浓度/(g/L) B	磷酸氢二钾质量浓度/(g/L) C
1	8.4	8	25
2	8.1	6	20
3	7.8	4	15

2.2.2 正交实验 因素 A、B 和 C 分别放在第 1、2 和 5 列,3、4、6、7、8 和 9 列分别是 A 和 B,A 和 C,B 和 C 的交互实验.实验的正交表设计和结果见表 2.

2.2.3 方差分析 对正交实验进行方差分析,结果见表 3.从方差的结果看,因素 B 高度显著,根据 K_1、K_2、K_3 的大小,最优水平选取 B_3,其他的因素及交互作用都不显著.根据方差的大小,培养基的最优配比为 $B_3A_3C_2$.从正交实验结果看,高浓度的氮源对菌体的生长有抑制的作用;起始 pH 值和磷酸盐浓度对聚唾液酸和产量的影响不大.因为产物的合成需要有氮元素的存在,所以氮源的浓度又不能太低.通过正交实验确定,起始 pH 值为 7.8,氯化铵质量浓度 4 g/L,磷酸盐质量浓度 20 g/L.

2.3 胰蛋白胨质量浓度对聚唾液酸产量的影响

有机氮源胰蛋白胨质量浓度对聚唾液酸产量的影响如图 2 所示.胰蛋白胨质量浓度较低时,生物量和聚唾液酸的质量浓度都比较低,随着胰蛋白胨质量浓度的增加,两者的质量浓度明显增加.但是,继续增加胰蛋白胨质量浓度,两者的质量浓度又会有所下降,说明过高的胰蛋白胨质量浓度会影响聚唾液酸的产量和菌体的生长.因此,选择 1.5 g/L 的胰蛋白胨质量浓度作为最佳的有机氮源质量浓度.

万方数据

表 2　正交表设计和结果

Tab. 2　The 3×6 factorial central composite designs and response values used to optimize yield of polysialic acid

实验号	A	B	A×B		C	A×C		B×C		SA	产酸率
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	476.9	275.7
2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	555.9	339.0
3	1	1	1	1	3	3	3	3	3	1516.9	447.5
4	1	2	2	2	1	1	1	2	2	1908.2	466.5
5	1	2	2	2	2	2	2	3	3	2330.3	412.4
6	1	2	2	2	3	3	3	1	1	2433.3	540.7
7	1	3	3	3	1	1	1	3	3	2766.2	559.9
8	1	3	3	3	2	2	2	1	1	3641.4	632.2
9	1	3	3	3	3	3	3	2	2	3112.8	637.9
10	2	1	2	3	1	2	3	1	2	490.6	286.5
11	2	1	2	3	2	3	1	2	3	703.4	370.0
12	2	1	2	3	3	1	2	3	1	789.2	288.0
13	2	2	3	1	1	2	3	2	3	2251.4	407.9
14	2	2	3	1	2	3	1	3	1	2000.8	741.0
15	2	2	3	1	3	1	2	1	2	1928.7	584.5
16	2	3	1	2	1	2	3	3	1	2965.3	672.4
17	2	3	1	2	2	3	1	1	2	3425.2	896.6
18	2	3	1	2	3	1	2	2	3	2659.8	770.9
19	3	1	3	2	1	3	2	1	3	974.6	214.2
20	3	1	3	2	2	1	3	2	1	1420.8	488.2
21	3	1	3	2	3	2	1	3	2	2598.0	669.6
22	3	2	1	3	1	3	2	2	1	2282.3	573.4
23	3	2	1	3	2	1	3	3	2	2690.7	713.7
24	3	2	1	3	3	2	1	1	3	2886.3	843.9
25	3	3	2	1	1	3	2	3	2	2539.7	564.4
26	3	3	2	1	2	1	3	1	3	3088.8	768.4
27	3	3	2	1	3	2	1	2	1	1695.3	691.9
K_1	18741.9	9526.3	19459.3	16054.4	16655.2	17729.3	18460.3	19345.8	17705.3	$\sum x_i = 56132.8$	
K_2	17214.4	20712	15978.8	20715.5	19857.3	19414.5	17701.9	16589.9	19249.8		
K_2	17214.4	20712	15978.8	20715.5	19857.3	19414.5	17701.9	16589.9	19249.8		
K_3	20176.5	25894.5	20694.7	19362.9	19620.3	18989	19970.6	20197.1	19127.7	$\sum x_i^2 = 1.39E+08$	
$\sum K_i^2$	1.05E+09	1.19E+09	1.06E+09	1.06E+09	1.05E+09	1.05E+09	1.05E+09	1.05E+09			

万方数据

表3 方差分析

Tab.3 Analysis of variance for the yield of polysialic acid obtained from the experimental results

$F_{0.05}(2,8)=4.46, F_{0.01}(2,8)=8.65, F_{0.05}(4,8)=3.84, F_{0.01}(4,8)=7.01.$

方差来源	平方和	自由度	平均平方和	F	显著性
A	487606.67	2	243803.3334	0.90	
B	15551710.11	2	7775855.055	28.74	* *
C	707460.78	2	353730.3889	1.31	
$A\times B$	26.6717.78	4	651679.4445	2.41	
$A\times C$	467073.78	4	116768.4444	0.43	
$B\times C$	958898.11	4	239724.5278	0.89	
误差	2164086.78	8	270510.8474		
总和		26			

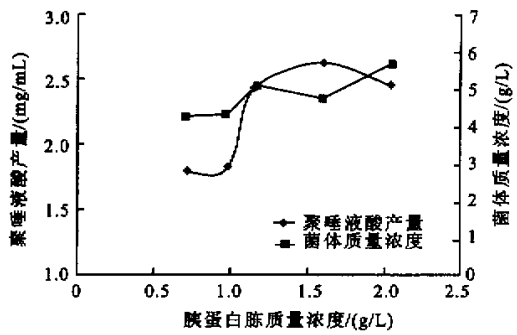

图2 胰蛋白胨质量浓度对聚唾液酸产量的影响

Fig.2 Effect of tryptone concentration on yield of polysialic acid

2.4 硫酸镁质量浓度对聚唾液酸产量的影响

不同微生物对无机盐的利用往往有很大差别.硫酸镁质量浓度对聚唾液酸产量的影响见图3.

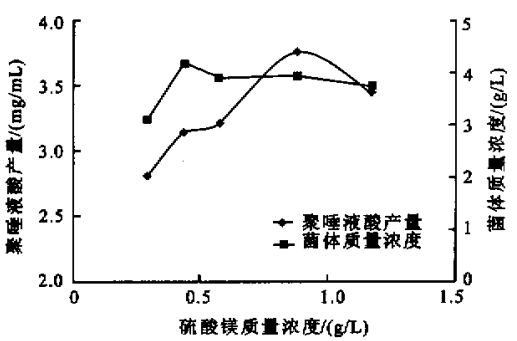

图3 不同硫酸镁质量浓度对聚唾液酸产量的影响

Fig.3 Effect of $MgSO_4$ concentration on yield of polysialic acid

可以看出,Mg^{2+}在低质量浓度下对聚唾液酸产量影响不大,但是生物量却是在0.45 g/L的时候最大,也说明在这个质量浓度下Mg^{2+}能够最大限度地利于菌体的生长;随着Mg^{2+}质量浓度的增加生物量的变化不明显,但在0.9 g/L的时候聚唾液酸的产量达到最大值,在这个质量浓度下,Mg^{2+}有利于激活合成聚唾液酸所需要的酶;Mg^{2+}质量浓度进一步增加后,聚唾液酸的产量又有所下降,说明Mg^{2+}质量浓度过高可能抑制一些酶的活力,所以选择0.9 g/L为硫酸镁的最佳质量浓度.

2.5 装液量对聚唾液酸产量的影响

装液量和转速同为影响菌体生长溶氧供应的重要因素.因此在固定转速的情况下(250 r/min),采用不同的装液量来确定溶氧对聚唾液酸的影响.结果见图4.

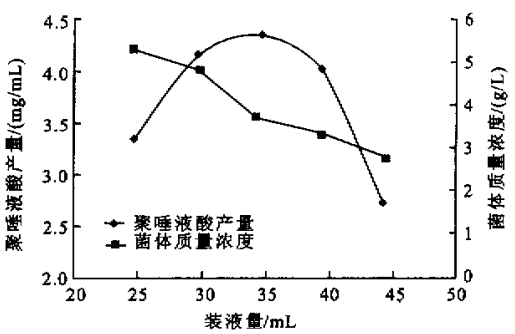

图4 装液量对聚唾液酸产量的影响

Fig.4 Effect of volume on yield of polysialic acid

从图4可以看出,生物量随着装液量的增加而降低,说明在高溶氧的条件下有利于菌体的生长;但是很高的溶氧导致菌体生长过于旺盛,吸收了大部分的碳源和氮源,用于合成产物的底物浓度很低,从而导致了产物合成的下降.所以,产物的合成有一个最佳的溶氧.虽然装液量在35 mL时生物量不是最大,可是它的聚唾液含量最高,这样不仅提高了聚唾液酸的产量,也提高了原料的利用率.

2.6 接种量对聚唾液酸产量的影响

接种量的多少和种龄的大小都会影响到发酵过程延迟期的长短和底物的吸收利用.因此,合适

万方数据

的接种量和种龄对于发酵是重要的.接种量对聚唾液酸产量的影响见图 5.

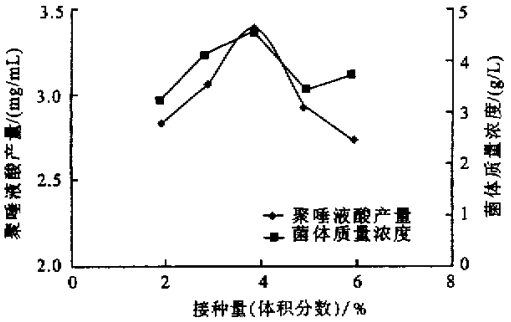

图 5　接种量对聚唾液酸产量的影响

Fig.5　Effect of inoculate volume on yield of polusialic acid

从图 5 可以看出,在 4% 的接种量(体积分数)时,菌体和聚唾液酸的产量都达到最大值,因此选择 4% 的接种量(体积分数)为最适接种量.经过正交实验和单因素实验得到了最佳的摇瓶发酵工艺,为了验证以上的实验结果进行了验证实验.结果表明,聚唾液酸发酵水平由原来的 2.5 mg/mL 提高到了 3.5 mg/mL 左右,提高幅度为 40% 左右.菌体的产酸率达到 900 mg/g 左右,而在化学诱变前其产酸率仅 200 mg/g 左右,且发酵周期没有改变,一直在 54～58 h.

3　结　论

对 WXJYL-11 进行摇瓶发酵工艺的研究,得到最佳培养基配方:山梨醇 40 g/L, K_2HPO_4 20 g/L, NH_4Cl 4 g/L, $MgSO_4$ 0.9 g/L,蛋白胨 1.5 g/L,起始 pH 值为 7.8.最佳培养条件:装液量为 35 mL(250 mL 的三角瓶中),转速 250 r/min,培养温度 37 ℃,接种量(体积分数)4%.

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.

[2] ZBIGNIEW J, KARL A. Carbohydrate in Drugs Design[M]. New York: Marcel Dekker, 1997.256－308.

[3] RODRIGUEZ-APARICIO L B, REGLERO A, ORTIZ A I. Effect of plysical and chemical conditions on the production of colominic acid by *Escherichia coli* in a defined medium[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 1988, 27:474－483.

[4] 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.

[5] SVENNERHOLM L. Quantitative estimation of sialic acids[J]. **Biochim Biophys ACTA**, 1957, 24:604－611.

[6] 郑志勇.聚唾液酸及唾液酸单体的发酵生产研究[D].无锡:无锡轻工大学,2001.

(责任编辑:朱 明)

接种量(体积分数)/%

万方数据