

透明质酸发酵流加过程的研究

叶 华 陈 猛 钟 林 谭天伟*
(北京化工大学生命科学技术学院, 北京 100029)

摘 要: 研究了透明质酸发酵的流加过程,对碳源的简单分批流加、指数流加、前中期指数流加 + 后期控制糖浓度的流加以及前期指数流加 + 中期控制糖浓度的流加这四种不同流加方式进行了探讨,得到最佳流加方式,透明质酸发酵水平稳定在 4 g/L 以上。

关键词: 透明质酸; 流加; 兽疫链球菌

中图分类号: TQ920.6

透明质酸(Hyaluronic acid,简称 HA)是一种具有特殊生理功能的酸性高分子粘多糖,广泛存在于高等动物的结缔组织中。由于其结构上的特点,HA 具有很强的保水性和高的粘弹性,在化妆品和医药工业中有着大量的用途^[1-2]。传统的获得 HA 的方法是动物组织提取法。由于原料来源有限、成本高、纯化复杂,产量难以满足日益扩大的需要。发酵法生产透明质酸克服了动物组织提取法原料缺乏、工艺复杂的缺点,降低了透明质酸的生产成本,大大推动了透明质酸的研究和应用^[3]。目前已有许多报道关于链球菌菌种诱变^[4]、合成机制^[5]、营养要求^[5]、以及采用分批发酵法进行透明质酸的生产^[6],但几乎没有关于透明质酸发酵流加过程的报道。本文研究了葡萄糖的流加规律,使透明质酸产量和分子量都得到了大幅度的提高,为工业化生产成功奠定了良好的基础。

1 材料与方法

1.1 菌种和培养基

实验菌种为兽疫链球菌 *Streptococcus zooepidemicus* (本实验室保存)。

斜面培养基组成 葡萄糖质量分数 0.5%,牛肉膏 0.5%,蛋白胨 1%,酵母粉 0.5%, K_2HPO_4 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%,琼脂 2.0%;pH 值 7.0~

7.2。

种子培养基组成 同斜面培养基,不加琼脂。

发酵培养基组成 牛肉膏质量分数 0.5%,蛋白胨 1%,酵母粉 0.5%, K_2HPO_4 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%

葡萄糖配成质量分数 50%的水溶液,单独灭菌。

1.2 实验方法

1.2.1 摇瓶种子培养 取保存于斜面的菌种两环,接入装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中,摇瓶转速 150 r/min,37℃,培养 14 h 左右。

1.2.2 小罐发酵培养 3.7 L 的发酵罐(瑞士比欧)中加入 2 L 发酵培养基(或采用美国贝朗 30 L 全自动发酵罐,加入 12 L 发酵培养基),116℃灭菌 25 min,接种量 10%,发酵温度 37℃,通气量 1.0~3.0 L/min(3.7 L 发酵罐)或 6.0~18.0 L/min(30 L 发酵罐),采用 5 mol/L NaOH 溶液自动调节控制发酵液 pH 值在 7.0 ± 0.1,初始转速 $n = 100$ r/min,不断提高转速,维持溶氧不低于 10%,直至 $n = 250$ r/min。葡萄糖采用流加方式补入发酵罐。

1.3 分析方法

菌体浓度测定 采用 600 nm 下发酵液的吸光值来表征菌体浓度,发酵液稀释 10 倍后用分光光度计在 600 nm 处测定吸光度(A_{600})。葡萄糖浓度定量分析 采用 SBA-40C 型生物传感分析仪(山东省科学院生物研究所)。L-乳酸浓度定量分析 采用发酵液稀释 SBA-40C 型生物传感分析仪(山东省科学院生物研究所)。HA 浓度测定 Bitter-Muir 氏法^[7]。

收稿日期: 2005-03-03

基金项目: 国家“863”项目(2002AA217022);国家自然科学基金项目(20306002);国家 973 项目(2003CB716002)

第一作者: 男,1979 年生,硕士生

*通讯联系人

E-mail: twtan@mail.buct.edu.cn

2 结果与讨论

2.1 间歇流加补糖()对透明质酸发酵的影响

在总糖浓度均为 5.5 % 的前提下,图 1 所示操

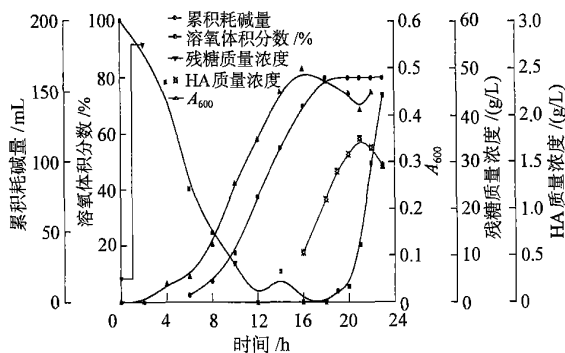


图 1 不流加葡萄糖对发酵过程的影响

Fig. 1 Effect of no glucose fed-batch on the fermentation

作方式为初糖 0.5 %, 2 h 一次补足葡萄糖 5 %;图 2 所示操作方式为简单的间歇流加,补糖方式为初糖质量分数 1 %, 2 h 1 %, 11.7 h 1.5 %, 17.7 h 1.5 %, 22 h 0.625 %。图 2 所示操作方式下 HA 质量浓度 (2.28 g/L) 明显优于一次性补糖方式 (图 1, 1.65 g/L), HA 产率提高了 38 %。

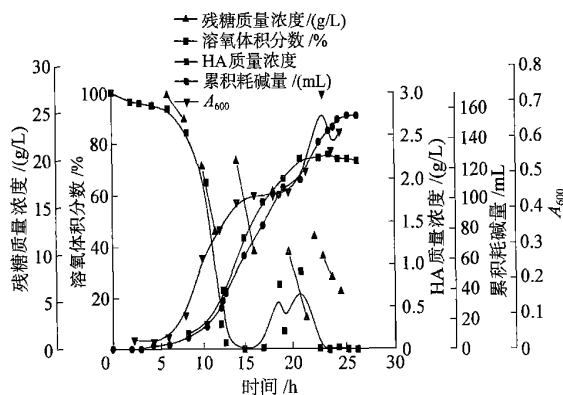


图 2 间歇流加对发酵过程的影响

Fig. 2 Effect of fitful fed-batch on the fermentation

22 h 0.625 %。图 2 所示操作方式下 HA 质量浓度 (2.28 g/L) 明显优于一次性补糖方式 (图 1, 1.65 g/L), HA 产率提高了 38 %。

从图 1 和 2 比较可以看出,高的初糖浓度容易导致发酵结束时菌体浓度偏低、DO 过早反弹、HA 合成停滞。这是因为:初糖浓度较高时,碳源更多的流向产物合成,只有较少比例用于合成菌体,图 1 所示发酵结束时菌体浓度明显偏低。HA 又是菌体分泌的产物,随着发酵的进行,大量副产物生成和葡萄糖的大量消耗,抑制了菌体生长和 HA 合成。

从图 2 还可以清楚地看到,从发酵中期开始,HA 的合成与菌体的生长、碱液的消耗都呈现相同

的趋势。碱液的消耗主要是因为发酵过程中链球菌不断分泌大量的乳酸和少量的醋酸所致。所以,HA 的分泌与发酵副产物乳酸的合成也是相关联的 (见图 3)。

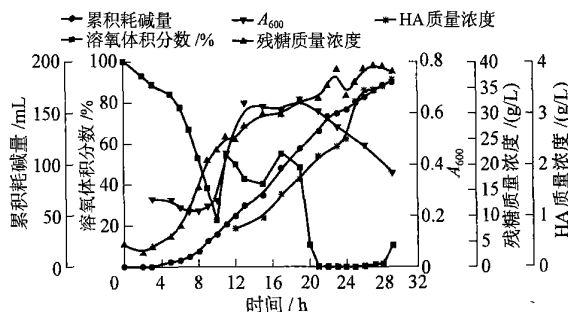


图 3 指数流加对发酵过程的影响

Fig. 3 Effect of exponential fed-batch on the fermentation

2.2 指数流加补糖()对透明质酸发酵的影响

Armstrong 等^[8]研究表明:在菌体生长阶段,生长代谢和产物合成之间对碳源和能量的利用存在着竞争。因此,由 2.1 节的分析可知,要提高 HA 的产量,在菌体生长的前中期提高菌体浓度是很有必要的。在对数生长期进行葡萄糖的指数流加比较符合菌体的生长需求。如图 3 所示,在葡萄糖指数流加的操作方式下,菌体浓度和 HA 产率都得到了明显提高。其补糖方式为:总补糖量为 5 % (质量分数),发酵体积 2 L, 6 h 开始流加至 17 h。与图 1 相比,菌体浓度提高了 70 %,与间歇流加 (图 2) 相比,HA 产率提高了 28.5 %。

2.3 前中期指数流加 + 后期控制糖浓度的流加补糖()对透明质酸发酵的影响

发酵前期采用指数流加,而发酵后期采取适当控制糖浓度的流加,控制质量浓度分别为 10, 20 g/L, 所得结果如图 4, 5 所示。从图 4, 5 中可以看出,虽然在这种流加方式下,菌体浓度较高,但是,在发酵 24 h 后维持 10 和 20 g/L 时,过高的糖浓度使得溶氧较早就开始反弹,耗碱减慢,发酵液中 HA 浓度也没有增加。所有这些迹象表明,发酵后期过高的糖浓度容易对 HA 的分泌造成抑制,不利于 HA 的合成。所以,在发酵后期采取控制糖浓度流加来提高发酵的产率不可取。

2.4 前期指数流加 + 中期控制糖浓度的流加补糖()对透明质酸发酵的影响

发酵前期采用指数流加,流加到发酵中期对糖浓度进行控制,所得结果如图 6 所示。在发酵中后

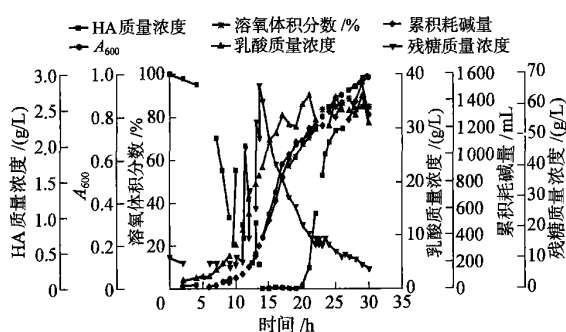


图4 发酵后期控制糖质量浓度 10 g/L
对发酵过程的影响

Fig.4 Effect of controlled glucose-concentration at
10 g/L in the anaphase on the fermentation

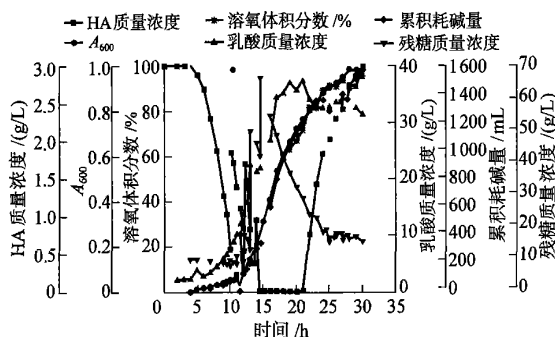


图5 发酵后期控制糖质量浓度 20 g/L
对发酵过程的影响

Fig.5 Effect of controlled glucose-concentration at
20 g/L in the anaphase on the fermentation

期透明质酸的合成基本上与副产物乳酸的生成是相关联的,但是随着透明质酸浓度增加而不断增加的乳酸浓度反过来又抑制着透明质酸的合成。由图6可以看到,在20~25 h,乳酸浓度直线上升,而HA

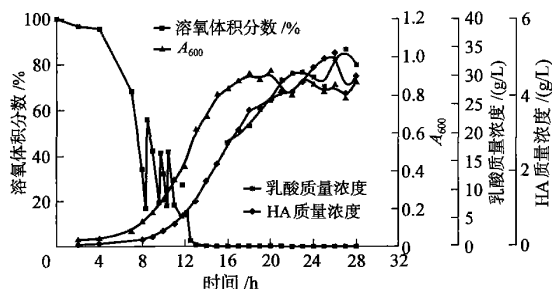


图6 控制发酵中期糖浓度对发酵过程的影响

Fig.6 Effect of controlling glucose-concentration in
the metaphase on the fermentation

浓度呈先上升而后下降的趋势;当26 h后乳酸浓度下降时,又可以很明显的看到HA浓度的增加,可见透明质酸浓度下降的趋势主要是由不断升高的乳酸浓度反馈抑制所引起的。通过控制发酵中期糖浓度,本文成功的降低了乳酸的反馈抑制,从而使透明质酸的产率得到大幅度提高,产率可达4.7 g/L,比指数流加(产率3.65 g/L)提高了28.8%。采用同样控制方法在1.5 m³发酵罐中进行发酵,取得了良好的生产效果,产率可达6 g/L以上,达到国内领先水平。

表1 不同流加方式对HA产量的影响

Table 1 Effect of fed-batch models on the yield of HA

流加方式	HA 产量/(g/L)	1.8~2.8	2.4~3.3	2.5~3.2	3.8~4.7
------	-------------	---------	---------	---------	---------

3 结论

发酵前期采用指数流加,中期对糖浓度进行控制,此时实验室小试产率可达4.7 g/L。将此控制方法应用于1.5 m³工业装置中,取得了良好的生产效果,产率可达6 g/L以上。

参 考 文 献

- [1] 罗瑞明. 透明质酸(HA)的国内外研究现状[J]. 宁夏农学院学报, 2001, 22(1): 63 - 64.
- [2] 凌沛学. 透明质酸[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000, 34 - 38.
- [3] 郭学平. 微生物发酵法生产透明质酸[J]. 精细与专用化学品, 2002, (3): 21 - 22.
- [4] 罗瑞明, 郭美锦, 储炬, 等. 生产透明质酸的兽疫链球菌 NUF-035 的筛选及摇瓶发酵条件[J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 22(1): 56 - 60.
- [5] 高海军, 陈坚, 章燕芳, 等. 营养条件对兽疫链球菌发酵生产透明质酸的影响[J]. 生物工程学报, 2000, 16(3): 396 - 399.
- [6] 汪嵘, 张云开, 韦航, 等. 透明质酸微生物发酵法生产工艺条件的研究[J]. 广西农业科学, 2001, 4: 190 - 192.
- [7] Bitter T, Muri H M. A modified uronic acid carbazide reaction[J]. Anal Biochem, 1960, 31: 426 - 428.
- [8] Armstrong D C, John M R. Growth and amino acid requirement of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus* [J]. Applied and Environment Microbiology, 1997, 63: 2759 - 2764.

(下转第26页)

致谢 本课题研究的完成由沈阳济世药业有限公司资助,北京化工大学制药工程专业赵晓丽同学参加了部分工作。

参 考 文 献

- [1] 储炬,蔡海波,胡千德,等. 人干扰素_{2a}酵母工程菌高产培养条件的研究[J]. 华东理工大学学报,2000,26(3):279-283.
- [2] 张庆义,张景海,胡金东,等. 重组人干扰素_{2a}分离纯化中试工艺研究[J]. 沈阳药科大学学报,2003,20(4):295-298.
- [3] 郭冬生,朱成钢,张耀洲,等. 人干扰素_{2b}胸腺肽₁融合基因在家蚕细胞中的表达和活性研究[J]. 生物化学与生物物理进展,2003,30(5):803-807.
- [4] J·萨姆布鲁克,D·W·拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 北京:科学出版社,2002.
- [5] F·奥斯伯,R·布伦特,R·E·金斯顿,等. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京:科学出版社,2001.
- [6] 中国生物制品标准化委员会编. 中国生物制品规程[M]. 北京:化学工业出版社,2000.

Molecular design and characterization of recombinant fusion protein of human IFN_{2a}-THY₁

ZHANG Xue-xia CHEN Jing-chun

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: The combined IFN_{2a} and THY₁ is more powerful than the individual of both IFN_{2a} and THY₁ medicines during treating human cancers and some virus infection diseases, and we considered to construct a fusion protein molecule containing both IFN_{2a} and THY₁ by DNA recombination. First of all, based on the three dimension structure of both molecules, a linker with 12 amino acid length was designed to connect to IFN_{2a} C terminal and THY₁ N terminal. After that, an expressed vector pCJ101 containing the fusion gene was obtained and transformed into host cell *E. coli* DH5. The main expressed protein band on SDS-PAGE possessed 23 000 in molecular weight. The biofunction test of the fusion protein showed the activity of IFN_{2a} reached 1.834×10^{-2} mol/(s·mg) and THY₁ reached 20 % (E-rosette formation rate), respectively.

Key words: interferon; thymosin; fusion protein; molecular design

(上接第 22 页)

Effect of fed-batch models on production of hyaluronic acid(HA)

YE Hua CHEN Meng ZHONG Lin TAN Tian-wei

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: At the same glucose wastage and different glucose concentrations in the beginning of the fermentation, four fed-batch models including simple batch-ferment (), exponential fed-batch (), exponential fed-batch in the prophase and metaphase + fed-batch by controlling the glucose concentration in the anaphase of the fermentation () and exponential fed-batch in the prophase + fed-batch by controlling the glucose concentration in the metaphase of the fermentation () were investigated. The result showed the () model was the best and the HA yield was 4.7 g/L.

Key words: hyaluronic acid; fed-batch; *streptococcus zooepidemicus*