

高产量、高分子量透明质酸发酵条件优化

成霞^{1,2}, 刘登如², 陈坚^{1,2}, 堵国成^{1,2}

(1. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036; 2. 江南大学生物工程学院环境生物技术研究室, 江苏 无锡 214036)

摘要: 研究了搅拌转速、初糖浓度及通气量对兽疫链球菌 *Streptococcus zooepidemicus* WSH24 发酵生产透明质酸的影响。研究表明, 搅拌转速对透明质酸产量及分子量影响很大, 搅拌转速为 200 r/min 时透明质酸产量达到 5.3 g/L, 平均分子量达到 1.88×10^6 Da, 产率系数为 0.13 g/g; 初始葡萄糖浓度为 65.8 g/L 时有利于透明质酸的生产, 产量达 5.9 g/L, 平均分子量达 1.90×10^6 Da, 产率系数为 0.17 g/g; 通气量对透明质酸的发酵也有较大影响, 通气量为 1.2 L/(min·L) 时透明质酸的产量及分子量均高于 0.5 L/(min·L) 时的发酵结果。

关键词: 透明质酸; 兽疫链球菌; 发酵条件优化

中图分类号: Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2006)05-0809-05

1 前言

透明质酸(Hyaluronic Acid, Hyaluronan, HA)又名玻璃酸, 是一种直链的高分子酸性粘多糖, 广泛存在于生物体的结缔组织中。HA 是由(1~3)-2-乙酰氨基-2-脱氧- β -葡萄糖(1~4)-O- β -D-葡萄糖醛酸双糖重复单位组成的^[1], 是国际上公认的最好的保湿剂, 具有保湿、营养、润肤等作用, 因而广泛地用于各种高级化妆品中。HA 还应用于眼科手术、关节注射、医用整形材料等方面。HA 的生产方法有动物器官提取法和细菌发酵法。细菌发酵法与动物组织提取法相比, 具有生产规模不受动物原料限制、发酵液中 HA 以游离状态存在、易于分离纯化、成本低、易于形成规模化工业生产、无动物来源致病病毒污染的危险等优点, 近年来随着发酵法生产 HA 技术的不断完善, 发酵法大有完全取代提取法的趋势^[2,3]。采用提取法从动物脏器中提取 HA 时, 由于原料有限, 生产成本居高不下, 造成商品价格昂贵, 限制了它在医药和化妆品中的广泛应用。

发酵法生产 HA 的研究主要在日本, 英国和美国也有少量报道。我国 HA 研究起步较晚, 产品多用于化妆品。近年来虽已有少量的医用 HA 产品问世, 但产品的质量和产量都不够理想。目前国内 HA 的发酵产率为 4~5 g/L, 从发酵液到最终产品的纯化收率为 60%~70%^[1,3,4]。国际先进的 HA 发酵产率为 6~7 g/L^[1,5]。

不同用途的 HA 对分子量有不同要求, 中等分子量的 HA 主要应用于化妆品, 而高分子量的 HA 可用于眼科粘性手术、治疗关节病、软组织修复和作为药物载体等, 特别是在预防和减少外科手术术后组织粘连中具有很高的应用价值^[2,4]。因此 HA 发酵生产中, 高产量、高分子量和高产率依然是研究的主要目标。

提高发酵法生产 HA 的产量及分子量的主要途径有 3 条: 筛选高产菌株, 优化营养条件, 优化环境条件。本工作在优化发酵培养基的基础上, 进一步优化了 HA 的发酵生产条件, 详细考察了初糖浓度及溶氧条件, 使 HA 的发酵产量及分子量有了较大幅度的提高, 产量达到 5.9 g/L, 平均分子量达到 1.90×10^6 Da, 并对生产菌 *Streptococcus zooepidemicus* WSH24 的生产性能有了新的发现。

2 材料与amp;方法

2.1 菌种

实验菌种为 *Streptococcus zooepidemicus* WSH24 (实验室保藏号)。

2.2 培养基

种子培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, 酵母粉 10.0, 蛋白胨 10.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.0, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.1, $CaCO_3$ 20.0, KH_2PO_4 2.0, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 1.47, $NaH_2PO_4 \cdot 12H_2O$ 0.64, $NaHCO_3$ 0.5; pH 7.2。

发酵培养基(g/L): 葡萄糖 65.8, 酵母粉 10.0, 蛋白胨 10.0, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 6.2, K_2SO_4 1.3, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.0, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005; pH 7.2。

2.3 培养方法

种子培养: 摇床转速 200 r/min, 温度 37℃, 500 mL 摇瓶装液量 50 mL, 培养时间 15 h。

发酵培养: 7 L 发酵罐(KoBio Techco., Ltd., 韩国)装液量 4.0 L, 温度 37℃, 接种量 10%, 通气量 4.8 L/min [1.2 L/(min·L)], 搅拌转速根据需要分别控制在 200 ($k_L a = 15 h^{-1}$), 350 ($k_L a = 20 h^{-1}$), 500 ($k_L a = 40 h^{-1}$), 650 r/min ($k_L a = 55 h^{-1}$), pH 用 5 mol/L NaOH 溶液自动控制在 6.9~7.0。

收稿日期: 2005-11-16, 修回日期: 2005-12-28

作者简介: 成霞(1981-), 女, 河北省张家口市人, 硕士研究生, 发酵工程专业; 堵国成, 通讯联系人, Tel: 0510-85888301, E-mail: gcdu@sytu.edu.cn.

2.4 测定方法

菌体量测定: 将发酵液适当稀释, 在 10 mL 发酵液中加入 10 mL 100 g/L 的三氯乙酸溶液, 混匀, 4000 r/min 下离心 20 min, 沉淀物于 105 °C 烘干至恒重, 称量。

葡萄糖含量测定采用 3,5-二硝基水杨酸法^[6], 透明质酸含量测定采用 Bitter-Muir 氏法^[2], 透明质酸分子量测定采用极限粘度法^[7]。

乳酸含量测定: 用 HPLC 检测发酵液中的乳酸含量。色谱柱为 SB-C18, Rapid Res, 4.6 mm×100 mm, 紫外检测器, 柱温 30 °C, 流动相为 0.5 mol/L KH₂PO₄(以磷酸调 pH 为 2.5), 流速 1 mL/min。

3 结果与讨论

3.1 搅拌转速对透明质酸发酵的影响

搅拌转速是影响发酵液溶解氧浓度的关键因素之一。透明质酸是 HA 产生菌荚膜的主要组成成分, 搅拌可以强化气-液间氧的传递, 既维持发酵液中有足够的溶氧, 为细胞的生长提供氧气, 又可使发酵液中的各营养基质混合均匀, 有利于细胞的吸收和利用, 同时可以加速荚膜从细胞表面脱离。该 HA 产生菌为兼性厌氧菌, 在 HA 的发酵工艺中, 大多数采用有氧发酵, 也有的采用厌氧发酵, 有氧发酵的碳源能量代谢可产生更多的三磷酸腺苷(ATP), 有利于三磷酸尿苷(UTP)生成, 而 UTP 是合成 HA 的 2 个活化前体物, 即 UDP(尿苷二磷酸)-葡萄糖醛酸和 UDP-N-乙酰氨基葡萄糖所必需的物质。因此从代谢调控角度看, 有氧发酵有利于 HA 的合成^[3,4]。但 Swann 等^[8]报道, 发酵液中氧含量高可使碳源

的代谢转向菌体增殖, 而 HA 的合成减少; 氧含量低时, 菌体增殖减少, HA 的合成增加。因此, 采用合适的搅拌转速对 HA 发酵很重要。

图 1 为不同搅拌转速对菌体生长、碳源消耗、HA 积累及乳酸产生的影响。对分批发酵过程各参数进行比较, 结果列于表 1。结合图 1 可以看出, 当搅拌转速为 200 r/min($k_L a=15 \text{ h}^{-1}$)时, HA 产量、HA 对碳源的产率系数($Y_{HA/C}$)及 HA 的平均分子量(M_n)均高于其他转速时的情况, 且发酵周期最短, HA 平均分子量达到了 $1.88 \times 10^6 \text{ Da}$, 比 650 r/min($k_L a=55 \text{ h}^{-1}$)时的 $1.15 \times 10^6 \text{ Da}$ 提高了 63%, 产率系数为 0.13 g/g, 比 650 r/min 时的 0.09 g/g 提高了 44%。该结果与已报道的类似研究结果不同, 其他研究者均发现较高搅拌转速有利于 HA 的发酵, 如高海军等^[4]的研究发现, 最有利于 HA 发酵的搅拌转速为 650 r/min, 此时 HA 产量为 4.1 g/L, 平均分子量约为 $1.70 \times 10^6 \text{ Da}$ 左右; Johns 等^[9]的研究表明, 最佳搅拌转速为 600 r/min。而本研究结果显示, 低搅拌转速(200 r/min)有利于提高 HA 的产量及分子量, 产生这种现象的原因可能是由于菌种之间的差异, 较低搅拌转速可满足该兼性厌氧菌所需的兼性厌氧条件, 使其生长良好, 合成更多产物 HA[图 1(c)]。HA 是由 HA 合成酶在细胞膜上合成并分泌到胞外的, 过高的搅拌转速产生了很强的剪切力, 一方面使正在链延长阶段的 HA 分子提前脱落, 影响了产物的进一步聚合及其产量, 另一方面 HA 分子在剪切力作用下可能发生断裂, 从而降低了产品的分子量。综合考虑 HA 产量、分子量及能耗, 搅拌转速采用 200 r/min 较有利于 HA 的生产。

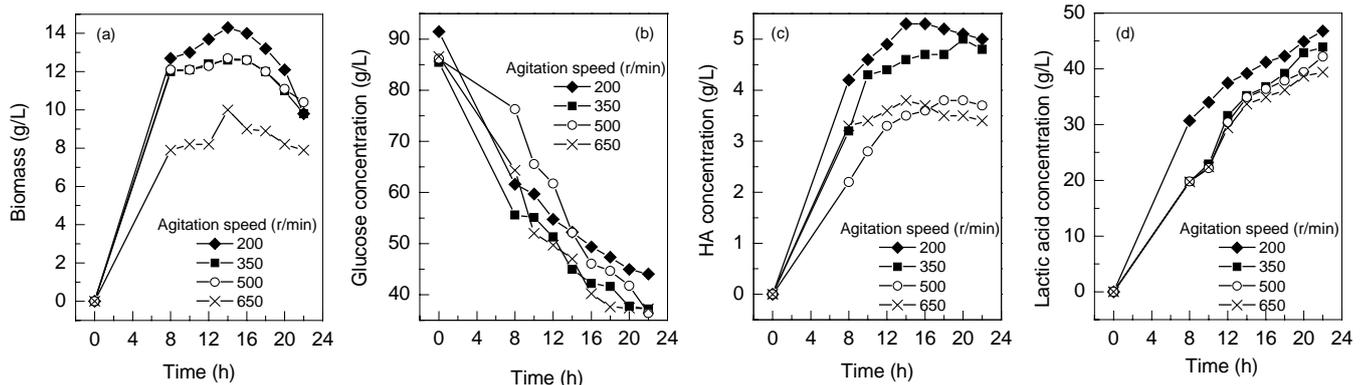


图 1 不同搅拌转速下的 HA 发酵过程曲线

Fig.1 Time courses of HA fermentation under different agitation speeds

表 1 搅拌转速对 HA 发酵结果的影响

Table 1 Effect of agitation speed on HA fermentation

Agitation speed (r/min)	HA (g/L)	$Y_{HA/C}$ (g/g)	Lactic acid (g/L)	$Y_{LA/C}$ (g/g)	M_n ($\times 10^6 \text{ Da}$)
200	5.3	0.13	46.8	0.99	1.88
350	5.0	0.12	43.9	0.91	1.60
500	3.8	0.09	42.2	0.85	1.54
650	3.8	0.09	39.4	0.80	1.21

许多链球菌的生长都伴随着乳酸的形成, 从某种程度上说, 有机酸的积累会对微生物生长代谢产生抑制作用。由图 1(a), 1(c)和 1(d)可以发现, 在较低搅拌转速(200 r/min)时, 在发酵中后期, 乳酸的浓度不断增加, 由此导致发酵 14 h 后, 细胞生长和 HA 的合成均停止, 且随

着乳酸浓度的进一步增高, HA 的产量有所下降. 该现象在高海军等^[4]的研究中也有报道, 乳酸产量随搅拌转速的降低而有所增加, 由 850 r/min 时的 41.0 g/L 提高到 300 r/min 时的 46.2 g/L. 本研究中搅拌转速 200 r/min 时乳酸积累量最高, 达到 46.8 g/L. 结合图 1(a)可见, 在低搅拌转速时, 菌体生长速率较快, 而乳酸积累量也相应较高, 因此可以分阶段控制不同搅拌转速来降低发酵中后期由于乳酸的不断积累而造成的对 HA 合成的影响, 即在发酵前期采用较低的搅拌转速(200 r/min), 使菌体细胞能快速生长, 发酵开始 10 h 后适当提高搅拌转速(350 r/min), 一方面可通过降低菌体的生长速率来降低乳酸的积累量; 另一方面由于此时发酵液很粘稠, 提高搅拌转速可以促进混合, 有利于 HA 发酵的进行. 本研究对上述策略进行了初步验证, 结果见图 2. 在发酵的前 10 h 搅拌转速为 200 r/min, 乳酸积累达到 33.9 g/L; 10 h 后将搅拌转速提高至 350 r/min, 乳酸增长速度逐渐变缓, 最终积累浓度为 39.5 g/L. 对照实验搅拌转速始终控制在 200 r/min, 乳酸最终积累量达到 46.8 g/L. 2 个

过程 HA 产量及分子量相差不大, 表明采用此策略可在不影响 HA 产量和分子量的前提下有效控制乳酸产量.

3.2 初糖浓度对 HA 发酵的影响

微生物的培养条件对其生长代谢有着重要的影响. 适宜的营养条件不仅有利于菌体的生长, 而且可以提高微生物对底物的利用能力, 使代谢向着有利于产物合成的方向进行. 碳源作为能源和细胞骨架的前体是细胞生长的基础, 研究初始碳源种类及浓度对提高发酵水平、了解发酵状况很有必要. 在分批发酵过程中, 碳源浓度决定着培养基的碳氮比, 直接影响到细胞的增殖速度, 但同时也要考虑到高浓度初始碳源产生的底物抑制效应^[10,11]. 结合其他研究者^[3,11]的研究成果及工业化的需要, 本研究选用葡萄糖为碳源. 由于 HA 链的合成需要葡萄糖单体及其所提供的能量, 初糖浓度对 HA 产量及分子量影响很大. 图 3 为不同初始葡萄糖浓度下的发酵过程曲线, 从图 3(a)可以看出, 菌体可以在较大的糖浓度范围内生长, 初糖浓度为 45.5~91.5 g/L 时, 菌体均能较好地生长, 但在较低初糖浓度下, 可以获得更高的菌体量, 结合图 3(b)所示的糖耗曲线, 初糖浓度为 45.5, 55.5, 65.8 g/L 时, 14 h 后残糖浓度分别为 5.4, 11.3, 31.4 g/L, 分别占总糖的 11.9%, 20.4%, 47.7%; 而当初糖浓度较高(91.5 g/L)时, 14 h 时残糖浓度为 52.2 g/L, 占总糖量的 57.0%, 说明较高浓度的糖对菌体生长有抑制作用.

图 3(c)为 *S. zooepidemicus* WSH24 在不同初糖浓度下合成 HA 的过程曲线, 结合图 3(a)可以看出, HA 的合成与菌体生长耦联, HA 产量与菌体量同时达到最高值. 图 3(d)为不同初糖浓度下乳酸积累的过程曲线, 随着 HA 发酵的进行, 乳酸的积累量不断增加, 在发酵中后期乳酸的积累速率有所下降.

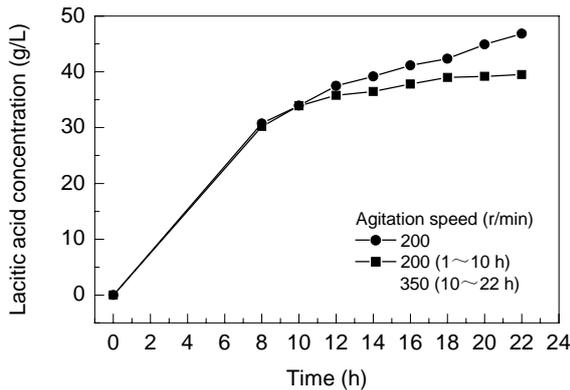


图 2 分步转速控制策略下乳酸产量的对比
Fig.2 Time course of lactic acid accumulation with bi-staged agitation speeds

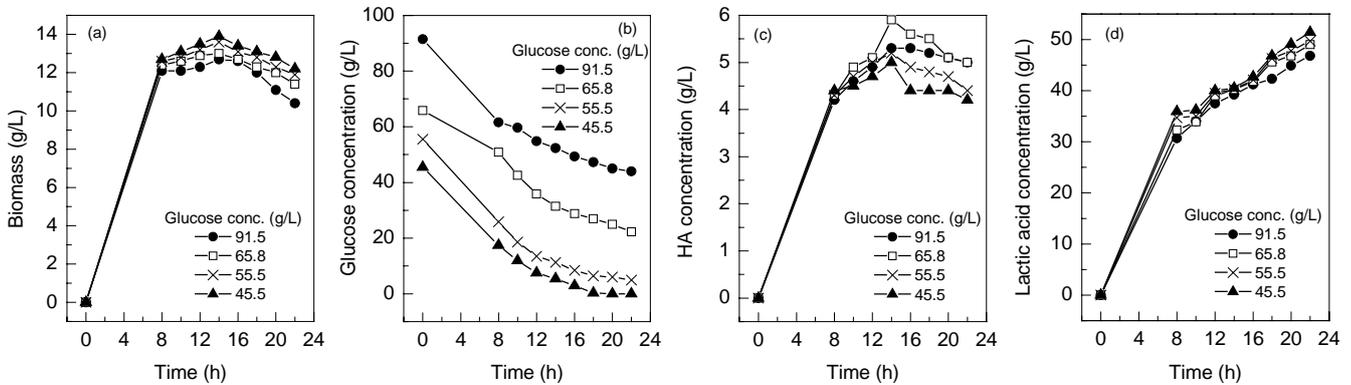


图 3 不同初糖浓度下的 HA 发酵过程曲线
Fig.3 Time courses of HA fermentation at different initial glucose concentrations

不同初糖浓度下 HA 分批发酵的结果见表 2。由表可以看出, 在初糖浓度为 45.5, 55.5, 65.8, 91.5 g/L 时, HA 最终产量可达 5.0, 5.2, 5.9, 5.3 g/L; HA 对碳源的产率系数($Y_{HA/C}$)在初糖浓度为 65.8 g/L 时达到最高, 为 0.17 g/g。乳酸积累量在初糖浓度为 45.5~65.8 g/L 范围内变化不大, 当初糖浓度提高到 91.5 g/L 时, 乳酸产量降低为 46.8 g/L。

表 2 初糖浓度对 HA 发酵结果的影响

Table 2 Effect of initial glucose concentration on HA fermentation

Glucose (g/L)	HA (g/L)	$Y_{HA/C}$ (g/g)	Lactic acid (g/L)	Y_{LAC} (g/g)	M_n ($\times 10^6$ Da)
45.5	5.0	0.12	51.4	1.13	1.43
55.5	5.2	0.12	49.7	0.98	1.56
65.8	5.9	0.17	49.0	1.13	1.90
91.5	5.3	0.14	46.8	0.99	1.88

表 2 结果表明, HA 的分子量在一定程度上受初糖浓度的影响。在一定的糖浓度范围内(45.5~65.8 g/L), 初糖浓度越高, HA 的分子量越高。基于 HA 分子量的大小取决于 HA 合成酶所聚合前体的数量、而过量表达合成酶又会导致其对底物竞争这一事实, 目前研究可从减少其对底物的竞争和提高 HA 合成底物浓度两方面提高 HA 分子量。较高的初糖浓度(91.5 g/L)为 HA 合成提供了充足底物, 有利于提高 HA 产量及分子量; 然而过量的葡萄糖在一定程度上抑制菌体生长, 不利于 HA 产量及分子量的提高^[10,11]。综合分析图 3(a), 3(c), 初糖浓度为 65.8 g/L 时, 促进了菌体生长, 有利于 HA 产量和分子量的提高。

分析图 3 和表 2, 综合考虑 HA 的产量、分子量及产率系数, 认为分批发酵生产 HA 采用 65.8 g/L 左右的初糖浓度较为适宜。

3.3 通气量对 HA 发酵的影响

通气量是影响供氧的一个重要因素, 增大通气量可增加罐内截面气速, 增加发酵液的气含率, 从而使气-液比表面积增大, 有利于氧的传递。但通过增加通气以提高氧传递速率的效果是呈递减性的, 即当气流速度较大时, 再增加其速度对提高氧传质效率的作用变小^[9]。

通气量对 HA 发酵的影响结果见表 3。由表可见, 低通气量情况下 HA 产量及分子量均不高, 而乳酸产量较高, 增大通气量时, 有利于提高 HA 产量和分子量。

通气量较高时能增加 NADH 氧化酶的表达量, 使 NADH/NAD 比值有所提高, 解除了 3-磷酸甘油醛脱氢酶的抑制作用, 从而增大糖酵解途径的流量, 产生更多的 ATP, 为 HA 的合成提供充足的能量, 可合成较多及较高聚合度的 HA^[11,12]。综合考虑能耗及 HA 产量和分

子量, 认为通气量为 4.8 L/min, 即 1.2 L/(min·L)时较有利于 HA 的生产。

表 3 通气量对 HA 发酵结果的影响

Table 3 Effect of aeration rate on HA fermentation

Agitation rate [L/(min·L)]	HA (g/L)	$Y_{HA/C}$ (g/g)	Lactic acid (g/L)	Y_{LAC} (g/g)	M_n ($\times 10^6$ Da)
1.2	5.3	0.14	46.8	0.99	1.88
0.5	3.9	0.10	48.5	1.02	1.07

4 结论

(1) 通过对小罐发酵中搅拌转速、初糖浓度及通气量的考察和分析, 当控制搅拌转速为 200 r/min、初糖浓度为 65.8 g/L 和通气量为 1.2 L/(min·L)时, 可以获得 HA 高产量、高分子量和高产率系数的统一。

(2) 本研究发现采用较低的搅拌转速(200 r/min)有利于 HA 的发酵。

参考文献:

- [1] 鲁念慈, 谭天伟. 透明质酸的制备及其应用 [J]. 功能高分子学报, 2001, (14): 370-376.
- [2] 凌沛学. 透明质酸 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000. 30-41.
- [3] 高海军, 陈坚, 章燕芳. 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, 2002, 16(3): 396-399.
- [4] 高海军, 陈坚, 堵国成. 搅拌与混合对兽疫链球菌发酵生产透明质酸的影响 [J]. 化工学报, 2003, 54(3): 140-146.
- [5] Cooney M J, Goh L, Lee P L, et al. Structured Model-based Analysis and Control of Hyaluronic Acid Fermentation by *Streptococcus zooepidemicus*: Physiological Implications of Glucose and Complex-nitrogen Limited Growth [J]. Biotechnol. Progr., 1999, 15(5): 898-910.
- [6] 宁正祥. 食品成分分析手册 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998. 9.
- [7] Laurent T C, Ryan M, Pietruszkiewicz A. Fraction of Hyaluronic Acid, the Polydispersity of Hyaluronic Acid, from the Bovine Vitreous Body [J]. Biochim. Biophys., 1960, 42: 476-485.
- [8] Swann D A, Sullivan B P, Jamieson G. Biosynthesis of Hyaluronic Acid [P]. US Pat.: 4897349. 1990-01-30.
- [9] Johns M R, Goh L T, Oeggerli A. Effect of pH, Agitation and Aeration on Hyaluronic Acid Production by *Streptococcus zooepidemicus* [J]. Biotechnol. Lett., 1994, 16: 507-512.
- [10] Kim J H, Deok-Kun Oh S Y. Selection of a *Streptococcus equi* Mutant and Optimization of Culture Conditions for the Production of High Molecular Weight Hyaluronic Acid [J]. Enzyme Microbiol. Technol., 1996, 19: 440-445.
- [11] David C A, Johns M R. Culture Conditions Affect the Molecular Weight Properties of Hyaluronic Acid Produced by *Streptococcus zooepidemicus* [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1997, 63(7): 2759-2764.
- [12] Chong B F, Nielsen L K. Amplifying the Cellular Reduction Potential of *Streptococcus zooepidemicus* [J]. J. Biotechnol., 2003, 100: 33-41.

Optimization of Fermentation Conditions of High Yield and High Molecular Weight Hyaluronic Acid

CHENG Xia^{1,2}, LIU Deng-ru², CHEN Jian^{1,2}, DU Guo-cheng^{1,2}

(1. Key Lab. of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi, Jiangsu 214036, China;

2. Lab. of Environmental Biotechnology, School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi, Jiangsu 214036, China)

Abstract: The effects of initial glucose concentration, agitation speed and aeration rate on hyaluronic acid (HA) production by *Streptococcus zooepidemicus* WSH24 were investigated in batch culture. The agitation speed had the most pronounced effect on HA yield and molecular weight. Under the condition of 200 r/min, the HA yield, $Y_{HA/C}$ and molecular weight could reach 5.3 g/L, 0.13 g/g and 1.88×10^6 Da, respectively. When the initial glucose concentration was 65.8 g/L, the HA yield, $Y_{HA/C}$ and molecular weight reached 5.9 g/L, 0.17 g/g and 1.90×10^6 Da, respectively. The aeration rate also affected HA fermentation. HA yield and molecular weight were higher at aeration rate of 1.2 L/(min·L) than those at 0.5 L/(min·L).

Key words: hyaluronic acid; *Streptococcus zooepidemicus*; fermentation condition optimization