

营养条件对兽疫链球菌发酵生产透明质酸的影响

高海军 陈 坚 章燕芳 堵国成

(无锡轻工大学生物工程学院环境与生物技术研究室 无锡 214036)

关键词 *Streptococcus zooepidemicus*, 透明质酸, 环境, 影响

中图分类号 Q815 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)03-0396-04

透明质酸(Hyaluronic acid,简称 HA)是 N-乙酰氨基葡萄糖胺和葡萄糖醛酸以 β -1-3 糖苷键和 β -1-4 糖苷键连接而成的二糖单体重复构建而成的杂多糖,广泛存在于高等动物的结缔组织内。由于结构上的特点,HA 具有很高的粘弹性和极强的保水性等特征,已被大量用于医学医药、化妆品工业^[1,2]。

1937 年 Kendall^[3]等发现用溶血性链球菌(*Streptococcus haemolyticus*)可以产生 HA。其后,陆续发现许多能产生 HA 的微生物菌种,逐渐开发出一条可替代传统的动物组织提取法^[4]生产 HA 的新途径——微生物发酵法^[5,6]。虽然已有许多报道关于链球菌生长的基本营养要求^[7,8],以及采用分批发酵法进行 HA 的生产^[6,9],但还没有关于营养条件对发酵生产 HA 的影响方面的报道。本研究采用兽疫链球菌(*Streptococcus zooepidemicus* H23),以复合氮源和葡萄糖为基质,研究了营养条件对 *Streptococcus zooepidemicus* 生长和合成 HA 的影响,以期为进一步研究 HA 的发酵生产提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌种:实验菌种为 *Streptococcus zooepidemicus* H23 (实验室保藏号)。

1.1.2 种子培养基(g/L):葡萄糖 20.0,酵母膏 10.0,牛肉膏 10.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.0, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.1, KH_2PO_4 2.0, $CaCO_3$ 20,此外另加 1 mL/L 微量元素液和 40 mL/L 缓冲液。其中,微量元素液含 $CaCl_2$ 2000 mg/L, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 24 mg/L, $ZnCl_2$ 46 mg/L, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 19 mg/L;缓冲液含: $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 36.76g/L, $NaH_2PO_4 \cdot 12H_2O$ 15.98 g/L, $NaHCO_3$ 12.5 g/L。调 pH7.2,121℃ 灭菌 15 min。

1.1.3 发酵培养基(g/L):酵母膏 20.0, K_2SO_4 1.3, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.0, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 6.2, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005。另加 2.5 mL/L 微量元素液,摇瓶发酵葡萄糖 40 g/L,小罐发酵葡萄糖 50 g/L。调 pH7.2,121℃ 灭菌 15 min。

1.2 培养方法与测定方法

1.2.1 种子:取保存于斜面的菌种两环,接入装有 50 mL

种子培养基的 500 mL 三角瓶中,摇瓶转速 $250 r \cdot min^{-1}$, 37℃ 培养 14 h 左右。

1.2.2 摇瓶发酵:将培养好的种子接入装有 50 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中,接种量 10%,其余条件同种子。

1.2.3 小罐发酵:2.5 L 的发酵罐(韩国 KFC)中加入 1.2 L 发酵培养基,121℃ 下灭菌 15 min。接种量 10%,发酵温度 37℃,pH7.0 \pm 0.1,通气量 $2.4 L \cdot h^{-1}$,搅拌转速 $650 r \cdot min^{-1}$ 。

1.2.4 测定方法:HA 含量测定用 Bitter-Muri 氏法^[10];葡萄糖含量测定用 3,5-二硝基水杨酸法^[11];菌体量(biomass)测定用分光光度计于 620 nm 下测量经过稀释后的发酵液吸光度与细胞标准曲线对照计算;HA 分子量测定用 Lauremt 法^[12];乳酸测定用对羟基联苯法^[13];氨基酸测定用氨基酸分析仪法。

2 结果和讨论

2.1 HA 合成的代谢分析

微生物生长的前提是有充足的碳源、能源和生长必需的物质(自身合成或外源提供)。*Streptococcus zooepidemicus* 是一种营养要求很高的微生物,TCA 循环不完全,有多种氨基酸不能自身合成^[7,9],需提供许多生长必需物质。从图 1 可以看出,使菌体大量合成 HA 的前提条件是,提供能量,合成 HA 前体物质,以及合成菌体组成物质的途径畅通。核苷酸是细胞遗传物质的重要组分,是菌体生长的必要物质,同时 HA 的两种前体物质 UDP-葡萄糖醛酸(UDP-GlcA)和 UDP-N-乙酰氨基葡萄糖(UDP-GlcNAc)中均含有 UDP,UDP 循环参与了 HA 的合成,而 *Streptococcus zooepidemicus* 不能完全由自身合成核苷酸^[8](图 1 中④),所以只有保证充足的核苷酸,特别是 UMP 的供给,微生物才能正常生长代谢、合成 HA。同时,由于多种氨基酸的缺陷,外源氨基酸必须均衡全面,这样细胞才能顺利地生长,各种酶系才能顺利地发育。本实验首先选择了一种最适合 *Streptococcus zooepidemicus* 生长发酵的有机氮源,在此基础上考察各种核苷酸对发酵的影响,研究氨基酸在发酵生产 HA 过程中的需求,并对影响较

大的因素进行了优化。

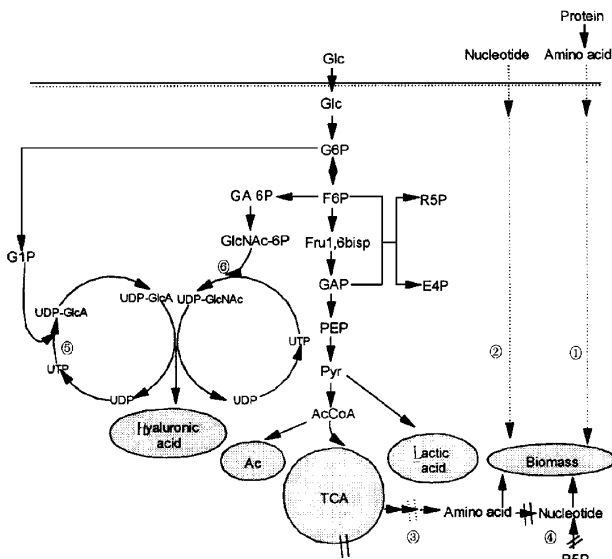


图1 *Streptococcus zooepidemicus* 生长与合成 HA 的代谢示意图

2.2 不同氮源对发酵结果的影响

氮源不仅为菌体生长提供氮元素,而且大多数有机氮源还能提供多种的生长因子。本实验对几种常见的有机氮源进行了实验,结果见表 1。从表 1 可知,当发酵培养基的氮源采用酵母膏时,HA 的产量最高,接近于 $0.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,同时菌体量也最高,其次为酵母膏和蛋白胨的混合氮源以及玉米浆,其余均很低。不加氮源仅利用种子中带入的氮源也可以生长一定量的菌体和产出一定的 HA。但菌株不同,情况可能不一样,安海平等^[10]发现对于马链球菌(*Streptococcus equi*)N2506,蛋白胨是最好的氮源。

表 1 培养基的不同氮源组成对 HA 产量的影响

Nitrogen source/($10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)	HA/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	Biomass/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
YE	0.286	0.429
BE	0.090	0.187
Pep	0.054	0.099
Crystine	0.029	0.145
CSL	0.202	0.374
SCHP	0.111	0.141
YE($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)+BE($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.128	0.258
YE($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)+Pep($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.232	0.351
BE($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)+Pep($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.097	0.252
No nitrogen	0.058	0.078

YE:Yeast extract, BE:Beef extract, CSL: Corn steep liquid

Pep:Peptone SCHP: Soybean cake hydrolysis product

2.3 核苷酸类物质对发酵生产 HA 的影响

2.3.1 不同碱基对发酵的影响:在摇瓶培养基中添加各种碱基,考察腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶

(T)、尿嘧啶(U)对 HA 生产的影响,实验结果如表 2 示。添加尿嘧啶后 HA 的产量提高显著,同时菌体量也明显增加,而添加其它碱基对 HA 的合成没有明显的影响。酵母膏是一种复合有机氮源,含有多种生长因子,其所含大部分碱基类物质已基本能满足微生物的生长代谢,但其所提供的尿嘧啶显然不能满足要求,所以必须在发酵过程中添加适量的尿嘧啶。

表 2 各种碱基类物质对 HA 生产的影响

Bases	U	A	T	G	C	空白
DCW/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	3.13	2.40	2.31	2.36	2.45	2.32
HA/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.403	0.292	0.298	0.298	0.328	0.298

2.3.2 添加尿嘧啶发酵生产 HA:根据以上实验结果,进一步对尿嘧啶添加量进行研究,结果见表 3。当尿嘧啶的添加量为 $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,DCW、HA 量最高,而过高的添加量对菌体生长和产物合成有抑制。从图 1 可以看出,在合成 HA 的过程中,UDP 是可循环利用的。因此,HA 发酵对尿嘧啶的需求量并不是很大,只有控制其在一个合适的浓度,才能促进菌体生长和 HA 形成,太高的尿嘧啶浓度反而会对 HA 的合成形成抑制。

表 3 尿嘧啶对 HA 发酵的影响

The amount of uracil/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.03	0.05	0.08	0
Biomass/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	2.890	3.250	2.910	2.460
BA/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.399	0.408	0.374	0.305

2.4 维生素对 HA 生产的影响

参考已有研究[7],考察了 8 种维生素对发酵结果的影响,实验结果如表 4 所示。由表可以看出,采用摇瓶方法,在培养基中加入一定量的维生素没有使 HA 的产量有明显的提高,反而在添加了某些维生素后 HA 的产量有所下降。菌体在生长过程中对维生素的需求量非常小,酵母膏中含有的各种维生素已能满足这种需求,故再另行添加只会造成维生素过量,对菌体生长和 HA 合成形成抑制。

2.5 氮源中氨基酸对 HA 发酵的影响

2.5.1 小罐 HA 发酵过程的氨基酸分析:微生物生长约需 20 种氨基酸,对于有多种氨基酸缺陷的 *Streptococcus zooepidemicus* 来说,其生长和代谢需要供给各种氨基酸。均衡的供给各种氨基酸,可消除少部分氨基酸的限制,减轻过量氨基酸的抑制,有利于菌体正常的生长和代谢。本实验对发酵过程中游离氨基酸的变化进行考察,以确定各种氨基酸的利用情况,结果如表 5 所示。由表可以看出,在测定的 16 种常见氨基酸中,精氨酸(Arg)是明显缺乏的,在整个发酵过程中,几乎都不能检出。细胞在生长过程中分泌出胞外蛋白酶,将胞外蛋白质降解成氨基酸,以供细胞吸收利用,如果细胞所需的氨基酸的比例与所降解得到的氨基酸的不一致,那么就就会有部分氨基酸限制微生物的生长。在全氨基酸分析

中,Arg 的比例是比较高的(数据未给出),说明细胞对 Arg 需求量比较高,分解外源蛋白中生成游离态 Arg 的速度满足不

了菌体生长和产物合成的需求,故而表现出游离 Arg 量始终为 $0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

表 4 维生素对 HA 生产的影响

	CoQ	V _H	Nicotinamide	V _{B2}	Pantothenic acid	V _{B12}	V _{B6}	V _{B1}	Blank
The amount of Vitamin/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.8	0.01	2.0	0.4	0.8	0.1	1.0	0.4	
HA/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.399	0.372	0.389	0.348	0.393	0.407	0.403	0.460	0.433

表 5 分批发酵过程中游离态氨基酸的变化

Amino acid ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	t/h				
	2	6	8	12	16
Asp	0.34	0.33	0.33	0.42	0.37
Thr	0.34	0.32	0.33	0.31	0.19
Ser	0.32	0.37	0.38	0.22	0.05
Glu	0.86	1.37	1.31	1.51	1.27
Gly	0.26	0.24	0.25	0.16	0.24
Ala	0.71	0.70	0.72	0.67	0.51
Cys	0.06	0.06	0.06	0.11	0.09
Val	0.51	0.48	0.51	0.52	0.37
Met	0.17	0.17	0.17	0.17	0.12
Ile	0.42	0.41	0.43	0.39	0.23
Leu	0.80	0.78	0.81	0.71	0.47
Tyr	0.15	0.14	0.14	0.13	0.09
Phe	0.41	0.40	0.41	0.39	0.30
Lys	0.38	0.34	0.36	0.44	0.37
His	0.10	0.10	0.10	0.12	0.10
Trp	0.10	0.08	0.09	0.09	0.07
Pro	0.18	0.19	0.19	0.23	0.22
Arg	0	0.02	0	0	0

2.5.2 精氨酸添加量对 HA 摇瓶发酵的影响:根据以上分析,采用摇瓶发酵考察培养基中另外添加 Arg 对 HA 发酵的影响。结果如表 6 所示。由表可以发现,添加了精氨酸的 HA 产量都比不添加的高,当加量从 $0.02 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 增加到 $0.06 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,HA 产量从 $0.412 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 增加到 $0.510 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。继续提高加量,HA 量逐渐降低。说明过高的 Arg 用量会对 HA 合成产生抑制。

表 6 精氨酸对 HA 发酵的影响

The amount of arginine/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1	空白
HA/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.412	0.4462	0.510	0.434	0.418	0.332

3.2.3 营养因子对小罐发酵生产 HA 的影响:根据摇瓶实验所得 Arg 和 U 的添加量,在 2.5L 小型发酵罐进一步考察添加氨基酸和碱基对 HA 的发酵的影响。与不添加精氨酸、尿嘧啶的小罐实验结果进行比较,结果如图 2 所示。

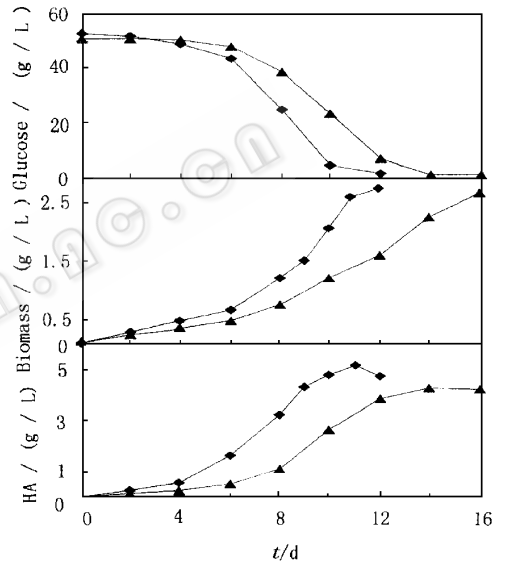


图 2 营养因子对小罐发酵生产 HA 的影响
▲不添加营养因子;◆添加营养因子

由图 2 可以看出,添加和不加营养因子发酵过程有显著差异。在添加了营养因子以后,菌体开始就以较高速率合成,延滞期变得不太明显,生长速率加快,最大比生长速率(μ_{max})也增大,从 0.54 h^{-1} 增加至 0.67 h^{-1} ,但在碳源消耗结束时最终菌体量却没有明显提高;HA 合成速率提高,最终 HA 浓度为由 $4.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 增加为 $5.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,提高了 24%;HA 的分子量也有提高,由 2.0×10^6 升至 2.15×10^6 。相应地,添加了营养因子后,发酵耗糖速率比不添加营养因子的要快得多,整个发酵过程只需 12 h 左右,仅为不加营养因子发酵时间的 2/3,提高了 HA 的生产强度。Amstrong^[7]等用全合成培养基(Cheical defined media)与酵母粉为复合氮源的培养基进行比较,发现在全合成培养基中 *Streptococcus zooepidemicus* 生长速率降低,HA 产率系数和比合成速率却与复合氮源中的类似。

参 考 文 献

- [1] Balaz E A ,Band P. Cosmetic Toilets ,1984 ,**99** 65~72
- [2] Swann D A ,Kuo J W. In :Byrom I(ed.) Biomaterials-novel materials from Biological Sources ,New York :Stockto Press. 1991 ,pp. 286~305
- [3] Kendall F E ,Heidelberger M ,Dawson M H. *J Biol Chem* ,1937 ,**118**(1) 61~69
- [4] Van Brunt J. *Bio/Technology* ,1986 ,**4** 780~782
- [5] Poli Stefano. European Patent ,EP0694616 A2 ,1/31/1996
- [6] Brown K K ,Ruia L L C ,Van de Rijn I. United States Patent 4782046 ,12/1/1988
- [7] Armstrong D C ,Cooney M J ,Johns M R. *Appl Microbiol Biotechnol* ,1997 ,**47** 309~312
- [8] Terleckyi B ,Shockman G D. *Infect Immun* ,1975 ,**11** 656~664
- [9] Johns M R ,Goh L T ,Oeggerli A. *Biotech Lett* ,1994 ,**16**(5) 507~512
- [10] Bitter T ,Muri H M. *Anal Biochem* ,1962 ,**4** 330~334
- [11] 北京大学生物化学系化学教研室. 生物化学实验指导 ,北京 :高等教育出版社 ,1989 ,p. 24
- [12] Laurent T C ,Ryan M ,Pietruszkiewicz A. *Biochim Biophys Acta* ,1960 ,**42** 476~485
- [13] Barker S B ,Summerson W H. *J Biol Chem* ,1941 ,**138** 535~554

Nutrition Condition of Hyaluronic Acid Fermentation with *Streptococcus zooepidemicus*

GAO Hai-Jun CHEN Jian ZHANG Yan-Fang Du Guo-Cheng

(Lab. of Environmental Biotechnology School of Biotechnology ,Wuxi University of Light Industry ,Wuxi 214036)

Abstract Based on the analysis of metabolic pathway *Streptococcus zooepidemicus* for hyaluronic acid(HA) synthesis , nucleotide ,especially uracil ,was considered to be important to cell growth and metabolism. When $0.005 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ uracil added in the media in which yeast extract as complex nitrogen source ,cell growth and HA production were increased by 32% and 34% respectively. From analysis of amino acid in fermentation process ,it was show that arginine(Arg)was needed for cell metabolism and concentration of free Arg maintained at $0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ in fermentation process ,which was proposed to limit cell growth and HA production. By shake-flask experiment HA concentration reached $0.510 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ when $0.06 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Arg added in the fermentation with 2.5 L fermentor ,when uracil $0.005 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ and Arg $0.06 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ were added ,the rate of cell growth increased ,maximum of specific growth rate ,concentration of HA and HA molecular weight reached 0.67 h^{-1} , $5.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ and $2.15 \times 10^6 \text{ Da}$ from 0.54 h^{-1} , $4.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $2.0 \times 10^6 \text{ Da}$,respectively.

Key words *Streptococcus zooepidemicus* hyaluronic acid fermentation nutrition