

文章编号: 1001-7453(1999)03-0017-06

兽疫链球菌摇瓶发酵法生产透明质酸

高海军, 陈 坚, 管轶众, 堵国成, 伦世仪

(无锡轻工大学生物工程学院, 江苏无锡 214036)

摘要: 研究了 *Streptococcus zooepidemics* H23 摇瓶发酵生产透明质酸的条件, 并对发酵机制进行了初步探讨. 研究发现, H23 在通风和厌氧条件下都能生产透明质酸. 透明质酸的合成和菌体生长是偶联的, 对不同的碳源质量浓度显示出不同的规律. 酵母膏、葡萄糖是合适的氮源和碳源, 初始质量浓度应分别为 2 g/dL, 4 g/dL. Mg^{2+} 对发酵有很大的影响, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 最佳质量浓度为 0.2 g/dL. 摇瓶条件如温度、通风等也影响透明质酸的形成, 温度 33℃, 摇瓶装液量 40 mL 时最有利于透明质酸合成. 在较适合的条件下, 透明质酸产量可以达到 0.47 g/L, 产物对碳源的转化率为 2%.

关键词: 透明质酸; 摇瓶发酵; 通风培养; 厌氧培养

中图分类号: TQ929.2 文献标识码: A

透明质酸 (hyaluronic acid, 简称 HA) 是以 β 1 \rightarrow 3 糖苷键连接的 N-乙酰氨基葡萄糖胺和以 β 1 \rightarrow 4 糖苷键连接的葡萄糖醛酸组成的二糖单体重复构成的杂多糖. 它广泛存在于高等动物的结缔组织内, 如关节滑液、玻璃样体液、脐带、皮肤、雄鸡冠等中. 由于结构上的特点, 当它在水溶液中时, 具有很高的粘弹性和极强的保水性. 目前, HA 已被大量用于临床医疗, 如“粘性手术”等. 它的衍生物也可以作为药物缓释载体、组织修复药物等, 在医学上有着广阔的应用前景^[1,2]. 传统的获得 HA 的方法是动物组织提取法^[3]. 但自 1937 年 Kendall 等^[4]发现溶血性链球菌 *Streptococcus haemolyticus* 可以产生 HA 后, 陆续有人报道发现了能产生 HA 的微生物菌种, 此方面已进行了大量的研究工作. 1983 年日本资生堂成功地开发出微生物发酵法生产的 HA^[5]. 发酵法生产 HA 克服了提取法原料缺乏、工艺复杂的缺点, 降低了 HA 的生产成本, 大大地推动了 HA 的研究和应用. 发酵法生产 HA 的研究早已开展, 但其报道多见于专利^[5-7]. 有关微生物较为详细的发酵机制和影响因素的研究报导却很少. 作者对一株链球菌进行了摇瓶发酵的初步研究, 考察了影响发酵的几种因素, 并对发酵机制进行了初步的探讨.

1 材料与方 法

1.1 菌种

实验菌种为 *Streptococcus zooepidemics* H23 (实验室保藏号).

收稿日期: 1998-09-08; 修订日期: 1999-04-22

作者简介: 高海军 (1969 年 9 月生), 男, 江苏滨海人, 博士研究生.

1.2 培养基

1.2.1 种子培养基 葡萄糖 20 g/L, 酵母膏 10 g/L, 牛肉膏 10 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 g/L, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.1 g/L, K_2HPO_4 2 g/L, 微量元素液 1 mL/L, 缓冲液 40 ml/L, $CaCO_3$ 20 g/L. 其中, 微量元素液内含 (mg/L): $CaCl_2$ 2 000, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 24, $ZnCl_2$ 46, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 19, 缓冲液内含 (g/L): $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 36.76, $NaH_2PO_4 \cdot 12H_2O$ 15.98, $NaHCO_3$ 12.5. 调 pH 至 7.2, 121°C 灭菌 15 min.

1.2.2 发酵培养基 葡萄糖 40 g/L, 酵母膏 20 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 g/L, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 6.2 g/L, K_2SO_4 1.3 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 5.0 mg/L, 微量元素液 2.5 ml/L, $CaCO_3$ 30 g/L. 调 pH 至 7.2, 121°C 灭菌 15 min.

1.3 实验方法

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 的三角瓶中, 摇瓶转速 250 r/min, 培养温度 37°C, 培养时间约 14 h. 将培养好的种子接入装有 50 mL 发酵培养基的 500 mL 的三角瓶中, 接种量为 10%, 其余条件同上.

1.4 测定方法

1.4.1 透明质酸含量测定 Bitter-Muir 氏法^[8].

1.4.2 葡萄糖含量测定 3,5-二硝基水杨酸法^[9].

1.4.3 菌体生长量 DCW (Dry Cell Weight) 的测定 将发酵液离心, 弃去上清液, 将菌体沉淀清洗两遍, 稀释至适当浓度, 用分光光度计在 620 nm 下测量吸光度, 并与标准曲线相对照, 计算菌体量.

2 结果与讨论

2.1 HA 发酵培养基的组成

2.1.1 氮源种类对发酵结果的影响 氮源不仅为菌体的生长提供氮元素, 而且大多数有机氮源还能提供多种必需的生长因子. 作者就几种常见的有机氮源对 HA 产量的影响进行了实验, 结果见表 1. 当采用酵母膏作为氮源时, HA 的产量最高, 接近 0.3 g/L, 同时 DCW 也最高; 其次为酵母膏和蛋白胨的混合氮源, 再次为玉米浆, 其余氮源的 HA 量和 DCW 均很低. 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. 当采用无机氮源 $(NH_4)_2SO_4$ 时, HA 和 DCW 都是实验组中最低的, 这说明无机氮源 $(NH_4)_2SO_4$ 对菌体的代谢有抑制. 表 1 还表明, 菌体含量高时, HA 含量也高. 据报道, 很多链球菌对营养条件的要求比较高, 而酵母膏中含有大量的生长因子, 这也是 *Streptococcus*

表 1 培养基的不同氮源组成对 HA 产量的影响

氮源 (%)	HA 产量 / (g/L)	DCW / (g/L)
酵母膏	0.286	0.429
牛肉膏	0.090	0.187
蛋白胨	0.054	0.099
胱氨酸	0.029	0.145
玉米浆	0.202	0.374
豆饼水解液	0.111	0.141
酵母膏+牛肉膏	0.128	0.258
酵母膏+蛋白胨	0.232	0.351
牛肉膏+蛋白胨	0.097	0.252
$(NH_4)_2SO_4$	0.032	0.046
无	0.058	0.078

注: 混合氮源中每种用量为 0.5%, $(NH_4)_2SO_4$ 为 0.2%

zooepidemics H23 以酵母膏为氮源时生长和

发酵较好的原因之一. 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.

2.1.2 氮源用量对发酵的影响 在发酵培养基中添加不同量的酵母膏进行实验, 结果见表

2可以看出,酵母膏用量低时,细胞产生的HA较低,DCW低,耗糖也很少.逐步提高酵母膏的用量,HA的含量、DCW、菌体对碳源的转化率(Y_x/s)均有较大幅度的上升,同时耗糖也增多,但HA对碳源的转化率(Y_p/s)变化不大.当酵母膏用量为2.0g/dL时,HA的含量、DCW、 Y_x/s 均达到最大值,此时耗糖最多.继续提高酵母膏的用量,耗糖减少,HA的含量、DCW、 Y_x/s 都逐渐下降,但 Y_p/s 反而上升.这说明虽然HA含量随酵母膏用量的继续升高而下降,但却有更大比例的碳源转化为HA. Amstron^g等^[11]在对一株链球菌进行研究后认为,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.据此,可以认为酵母膏中含有更有利于HA合成的因子,使得产物转化率随酵母膏用量的增多而不断提高.

表 2 酵母膏用量对发酵结果的影响

酵母膏用量/(g/dL)	残糖/%	DCW/(g/L)	(Y_x/s)/%	HA产量/(g/L)	(Y_p/s)/%
1.0	2.437	0.756	3.37	0.303	1.35
1.5	2.122	0.912	3.57	0.344	1.34
2.0	1.639	1.348	4.43	0.407	1.34
2.5	1.820	1.162	4.06	0.399	1.40
3.0	2.144	1.001	3.95	0.393	1.55
3.5	2.277	0.901	3.75	0.376	1.56

注:葡萄糖质量浓度为4.68g/dL

2.1.3 碳源种类对发酵的影响 不同微生物对碳源的利用情况不同,表3列出几种常见碳源合成HA时的情况.由表3可知,以葡萄糖作碳源,HA产量最高,其后依次是蔗糖和麦芽糖,而果糖、木糖、半乳糖等被利用的情况不好.其原因可能是尿苷二磷酸葡萄糖醛酸和N-乙酰尿苷二磷酸葡萄糖胺是合成HA的前体,也是合成菌体的前体,菌体可以容易地分解蔗糖、麦芽糖得到葡萄糖,所以蔗糖和麦芽糖可以被很好的利用,而其它的则相对差些.

表 3 培养基不同碳源组成对 HA 产量的影响

碳源	HA产量/(g/L)	碳源	HA产量/(g/L)
葡萄糖	0.225	木糖	0.112
果糖	0.122	半乳糖	0.154
蔗糖	0.201	麦芽糖	0.193

2.1.4 碳源用量对发酵的影响 碳源作为能源和细胞骨架的前体是不可或缺的,研究初始碳源质量浓度对提高发酵水平,了解发酵状况很有必要.图1为不同初糖质量浓度对最终发酵的影响.

图1显示,菌体生长量(DCW)和碳源对菌体的转化率(Y_x/s)随初糖质量浓度升高而下降,而产物HA及其转化率则呈相反的趋势.可以看出低的初糖质量浓度有利于菌体生长,促进碳源向菌体的转化.虽然随着初糖质量浓度的升高,糖消耗量不断增加(数据未给出),但DCW却不断下降,所以 Y_x/s 也不断下降.而在较高的初糖质量浓度下则有更多的底物转化为产物,HA含量和 Y_p/s 随着初糖质量浓度的升高而升高,直到初糖质量浓度为5g/dL.从代谢流角度来考虑,可以认为初糖质量浓度的不同直接影响着碳源代谢的流向,初糖

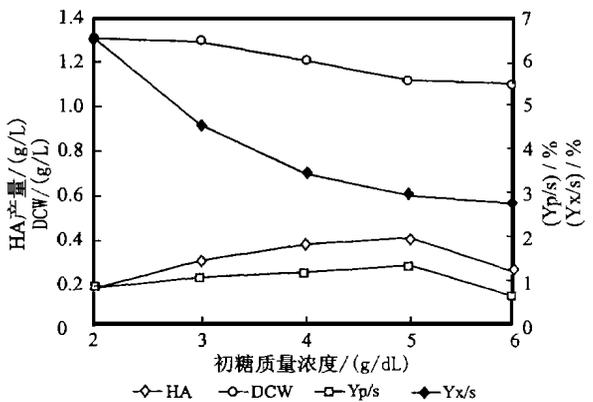


图 1 不同初糖质量浓度对菌体和产物的影响

质量浓度较高时,碳源更多的流向产物的合成,只有较少比例用于合成菌体.随着发酵的进行,大量副产物的形成抑制了菌体的生长和产物的形成,使得在高初糖下的残糖浓度较高,所以初糖质量浓度在 4 g/dL较为合适.

2.1.5 Mg²⁺对发酵的影响 在HA的合成途径中,透明质酸合成酶是一个关键酶,它催化HA的前体转化成HA,此酶的活性受Mg²⁺质量浓度的影响很大^[15].表4列出了不同MgSO₄·7H₂O用量时发酵培养基的最终发酵状况.可以看出,随着MgSO₄·7H₂O用量的逐步增大,耗糖增多,当MgSO₄·7H₂O用量从0.04 g/dL升至0.20 g/dL时,HA的产量达到最高,同时DCW也达到最大值.继续增大MgSO₄·7H₂O用量,HA的产量和DCW均开始下降.同样,在MgSO₄·7H₂O用量为0.20 g/dL时,Y_p/s最高,为1.44%,Y_x/s的变化也呈同样的规律.

表4 Mg²⁺对发酵结果的影响

MgSO ₄ ·7H ₂ O用量/(g/dL)	残糖/%	DCW/(g/L)	HA/(g/L)	(Y _p /s)/%
0.04	1.49	1.157	0.154	1.020
0.08	1.11	1.20	0.184	0.974
0.12	1.04	1.17	0.231	1.179
0.16	1.04	1.25	0.268	1.367
0.20	0.80	1.325	0.317	1.441
0.24	0.74	1.472	0.295	1.305
0.28	0.54	1.199	0.280	1.138
0.32	0.42	1.321	0.280	1.085
0.36	0.34	1.222	0.278	1.045

2.2 HA摇瓶发酵条件

2.2.1 温度对HA发酵的影响 温度是发酵过程中的一个关键因素,对菌体生长、代谢速度均产生影响.在不同的温度下,对菌体生长情况进行考察,结果见表5.

表5 不同温度对HA发酵的影响

温度/°C	残糖/%	DCW/(g/L)	HA/(g/L)	(Y _p /s)/%
30	0.902	0.485	0.288	1.37
33	0.768	0.460	0.472	2.11
35	0.774	0.556	0.335	1.57
37	0.863	0.763	0.312	1.46
39	0.952	1.203	0.295	1.44

由表5可知,不同温度下发酵的结果不同.发酵温度为33°C时,HA产量最高,达0.472 g/L.而DCW却在高温下较好,39°C时达1.203 g/L.从转化率上看,33°C时Y_p/s最高,而Y_x/s在39°C时最高.可以看出,高温有利于菌体生长,碳源更多地转化为菌体,

但不适合HA的形成.Armstrong等^[11]也发现在低温时,HA产量较高,而温度提高可以大大提高菌体的生长速率.Pace等^[12]也认为在低温时胞外多糖的产量更高,但Kim^[13]等则发现了相反的结果.关于温度如何对菌体生长和产物形成起作用,还有待进一步探讨.

2.2.2 供氧对HA生产的影响 *Streptococcus zooepidemicus* H23是一株兼性厌氧菌,供氧状况会直接影响其生长代谢及调控方式.

本实验中采用不同的装液量以及厌氧方式,来考察供氧状况对发酵产生的影响,结果如表6所示.可以看出,并非是供氧越充分对菌体生长和产物的形成越好.当定量瓶的装液量为40 mL时,HA的产量出现一个峰值,少于40 mL或多于40 mL,HA的产量均会下降.但对于DCW来说,

表6 不同装液量对HA发酵的影响

装液量/mL	残糖/%	DCW/(g/L)	(Y _x /s)/%	HA/(g/L)	(Y _p /s)/%
20	2.665	0.756	5.66	0.183	1.37
30	2.511	0.711	4.78	0.202	1.36
40	2.092	0.678	3.55	0.287	1.50
50	2.224	0.841	4.74	0.231	1.30
60	2.161	1.077	5.86	0.212	1.15
70	2.081	1.108	5.77	0.206	1.07
厌氧	2.281	0.927	5.39	0.221	1.29

却与 HA 呈相反的趋势,即在装液量为 40 mL 时 DCW 最低.从转化率来看,与 HA DCW 相同,在装液量为 40 mL 时, $Y_{p/s}$ 最高,而 $Y_{x/s}$ 最低.这说明控制合适的通风可以提高 HA 产量和碳源对 HA 的转化率.厌氧发酵时菌体也可大量生长,并合成较多的 HA,但与通风合适的情况相比,相差较大. Johns 等^[14]也发现,通风发酵既可以获得较高的 HA 质量浓度,又可得较高的转化率.原因可能就是由于分子氧的存在使得中间产物丙酮酸更多地被氧化成乙酸,从而得到更多的能量(每摩尔丙酮酸多 1 mol ATP).由于在摇瓶发酵条件下不能对发酵过程中的 pH 值进行较好的控制,且发酵过程中产生大量的乙酸和乳酸,抑制了菌体的生长和代谢,使得产物质量浓度难以有很大提高.

2.3 HA 摇瓶发酵过程曲线

图 2 为 H23 的摇瓶发酵过程曲线.从图中可以看出,在种子接入发酵培养基后约 3 h,细胞开始进入对数生长期,约 12 h 时 DCW 达到最高点 0.9 g/L, HA 也表现出相同的趋势,发酵进行约 12 h, HA 产量达到最高,为 0.37 g/L,这说明 HA 的形成与细胞生长是相偶联的.在此之后,菌体浓度和 HA 的产量开始下降,葡萄糖的利用速度变缓.

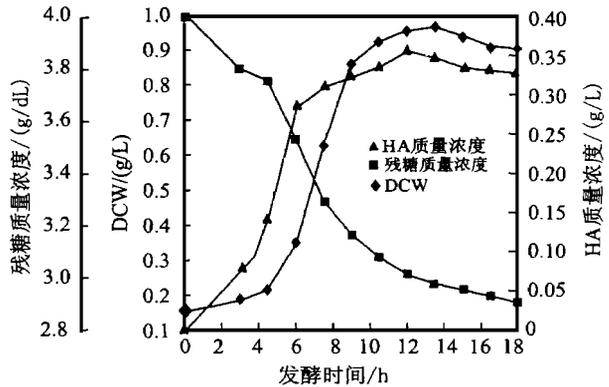


图 2 H23 的发酵过程曲线

3 结 论

1) 氮源、碳源对 *Streptococcus zooepidemicus* H23 发酵生产透明质酸有较大的影响,酵母膏、葡萄糖是最好的氮源和碳源,其质量浓度分别为 2 g/dL, 4 g/dL 时最适合发酵生产 HA.

2) Mg^{2+} 等金属离子,环境条件如温度、供氧等都对发酵有较大的影响.当 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 质量浓度为 0.2 g/dL,温度为 33 °C, 500 mL 的三角瓶装液量为 40 mL 时发酵,可以获得最大 HA 产量.

3) HA 的合成和菌体的生长对碳源的利用存在着竞争性,当碳源对 HA 转化率 ($Y_{p/s}$) 高时,碳源对菌体的转化率 ($Y_{x/s}$) 低.

4) 菌体在有氧和无氧条件下均能大量生长并合成 HA,但通风发酵可以获得更高的 HA 产量和产物的转化率.

5) HA 的合成和菌体的生长是相偶联的.条件合适时,菌体生长的同时伴随 HA 的合成,并且几乎在同时达到最大值.

参考文献:

- [1] BALAZ E A, BAND P. Hyaluronic acid Its structure and use[J]. Cosmetic Toilets, 1984, 99: 65- 72
- [2] BYROM D. Biomaterials—novel materials from biological sources [M]. Stockton Press New York, 1991, 286
- [3] VAN BRUNT J. More to hyaluronic acid than meets the eye[J]. Bio/technology, 1986, 4: 780- 782

- [4] KENDALL F E, HEIDELBERGER M, DAWSON M H A serologically inactive polysaccharide elaborated by mucoid strain of group A hemolytic streptococcus [J]. J Biol Chem, 1937, 118(1): 61~69
- [5] 赤坂日出道, 驹崎久幸, 柳光男. アルロン酸の製造方法 [P]. 日本公开特许公报: 昭 58- 56692, 1983-04-04.
- [6] MORA. Process for preparing hyaluronic acid [P]. U S Patent 5071751, 1991-11-10.
- [7] CULLIS-Hill D. Preparation of Hyaluronic acid PCT [P]. World Intellectual Property Organization WO86/06728, 1986-12-20
- [8] BITTER T, MURI H M. A modified uronic acid carbazol reaction [J]. Anal Biochem, 1962, 4 330~334
- [9] 北京大学生物化学系化学教研室. 生物化学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1989.
- [10] 姚敏杰, 安海平, 陈玉铭. 透明质酸发酵法制备研究之第二报: 透明质酸发酵工艺和提取工艺条件研究 [J]. 江苏食品与发酵, 1995, 2 19~ 25
- [11] ARMSTRONG D C, JOHNS M R. Culture conditions affect the molecular weight properties of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus* [J]. Applied and Environmental Microbiology. 1997, 63 2759~ 2764
- [12] PACE G W, RIGHELATO. Production of extracellular microbial polysaccharides [J]. Adv Biochem Eng, 1980, 15 41~ 69
- [13] KIM J-H, YOOS S-J, OH D-K, et al. Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture conditions for the production of molecular weight hyaluronic acid [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1996, 19 440~ 445
- [14] JOHNS M R, GOH L-T, OEGGERLI A. Effect of pH, agitation and aeration on hyaluronic acid produced by *streptococcus zooepidemicus* [J]. Biotech Lett, 1988, 15(5): 507~ 512
- [15] STOOLMILLER A C, DORFMAN A. The biosynthesis of hyaluronic acid by streptococcus [J]. J of Biol Chem, 1969, 244(2): 236~ 246

Study on Hyaluronic Acid (HA) Production with Shake-Flask Fermentation by *Streptococcus zooepidemics* H23

GAO Hai-jun, CHEN Jian, GUAN Yi-zhong, DU Guo-cheng, LUN Shi-yi
(School of Bioengineering, Wuxi University of Light Industry, Jiangsu Wuxi 214036)

Abstract The shaking-flask condition and composition of medium for hyaluronic acid (HA) fermentation by streptococcus zooepidemics H23 were studied, and the fermentation mechanism was also discussed. HA production was growth-associated fermentation and it could be produced under both aerobic and anaerobic conditions. Yeast extract and glucose were determined as proper N and C source, and their initial concentration were 2% and 4% respectively. Mg^{2+} also gave great effect on HA production, 0.2% $MgSO_4$ was optimum. Culture variables such as temperature and O₂ affected the fermentation, HA concentration and yield of HA to glucose achieved 0.47 g/L and 2.1% at 33°C with 40 mL medium in 500 mL flask.

Key words hyaluronic acid; shaking-flask fermentation; aerobic culture; anaerobic culture