

大肠杆菌 CCTCC M208088 发酵生产聚唾液酸的 pH 控制策略

刘金龙, 詹晓北*, 吴剑荣, 郑志永, 李国顺

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 研究了不同 pH 值控制策略对大肠杆菌 CCTCC M208088 发酵生产聚唾液酸的影响。采用高浓度磷酸盐培养基(20 g/L 磷酸氢二钾)缓冲 pH 值,聚唾液酸产量达到 1.9 g/L,但大量磷酸盐残留在发酵液中,影响聚唾液酸的后提取处理。把培养基中磷酸盐的质量浓度降至 2.5 g/L,同时流加 2 mol/L 氢氧化钠溶液控制 pH,聚唾液酸产量提升至 2.3 g/L,但是 NH_4^+ 在发酵前期 16 h 即消耗完毕。进一步采取氨水流加控制 pH 策略,聚唾液酸产量提升至 3.2 g/L,同时菌体浓度大幅增加至 12.5 g/L,导致 40 g/L 初始山梨醇在 20 h 耗尽。最后,在氨水控制 pH 的同时,向发酵体系中流加山梨醇,聚唾液酸产量和生产强度分别达到了 4.8 g/L 和 0.16 g/(L·h),比优化前(高浓度磷酸盐发酵)分别提高了 152%和 188%。

关键词: 大肠杆菌; 聚唾液酸; 发酵; pH

中图分类号:TQ 920 文献标志码:A 文章编号:1673-1689(2012)02-146-06

pH Control Strategy in the Polysialic Acid Fermentation Production by *Escherichia coli* CCTCC M208088

LIU Jin-long, ZHAN Xiao-bei*, WU Jian-rong, ZHENG Zhi-yong, LI Guo-shun

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Effect of the different pH control strategies on the PSA production by *Escherichia coli* CCTCC M208088 was compared in this study. Those strategies including: (1)when 20 g/L K_2HPO_4 was presented in the medium, the titer of PSA achieved at 1.9 g/L PSA, however, the high-level residual K_2HPO_4 in broth bring difficult to the following PSA purification. (2) with 2.5 g/L K_2HPO_4 and feeding of 2 mol/L NaOH solution, the titer of PSA was 2.3 g/L; (3)the PSA titer was increased to 3.2 g/L by feeding of ammonia water as pH control agent. Furthermore, the feeding of ammonia could accelerated sorbitol consummation; (4) To further promote PSA production, a novel strategy using ammonia water for pH control coupling with sorbitol supplementation at a constant feeding speed was adopted. As a result, PSA production and productivity were increased separately to 4.8 g/L and 0.16 g/(L·h), which was 152% and 188% higher than that of the control(without pH control).

Key words: *Escherichia coli*, polysialic acid, fermentation, pH

收稿日期: 2011-09-23

基金项目: 国家 863 计划项目(2006AA02Z207)。

作者简介: 刘金龙(1980-),男,河北石家庄人,发酵工程博士研究生,主要从事生化工程与反应器等研究。

E-mail: bdjlj2004@yahoo.com.cn

* 通信作者: 詹晓北(1962-),男,北京人,工学博士,教授,博士研究生导师,主要从事生化工程与反应器等研究。

E-mail: xbzhan@yahoo.com

聚唾液酸(Polysialic acid)是 N-乙酰神经氨酸以 α -2,8 和(或) α -2,9 糖苷键连接而成的同聚物^[1]。它不仅广泛存在于大多数哺乳动物体内,还以荚膜的形式附着在一些致病性细菌的表面^[2,3]。聚唾液酸具备无免疫原性、可降解等优点,是迄今发现的最为理想的药物缓释材料^[3]。另外,随着诱导和支持神经元细胞再生功能的发现,聚唾液酸逐渐被认定为现代脑科和中枢神经细胞修复手术中脚手架材料的最佳替代品^[4,5]。除了作为新型的生物材料,聚唾液酸降解后生成的 N-乙酰神经氨酸单体(Sialic acid),被广泛用作一系列药物的基础材料,用于癌症、发炎、流感的治疗,其中典型的代表如扎那米韦(Zanamivir),是目前防治禽流感病毒 H5N1 最有效的药物^[6,7]。

随着市场需求的增大,聚唾液酸及其衍生物的制备正引起越来越多人的关注,国内外先后有多个研究团队对细菌发酵法生产聚唾液酸进行了报道。如 Rodriguez-Aparicio 等人发现聚唾液酸合成受温度和溶解氧的显著影响,并构建了完全合成培养基,聚唾液酸产量达到了 1.3 g/L^[8]。Rode 等人优化了 *E. coli* K1 合成长链聚唾液酸的营养和培养条件,使其产量达 1.5 g/L^[9]。另外,印度的 Kapre 和 Shaligram 建立一种高相对分子质量聚唾液酸的生产工艺^[10],聚唾液酸产量在 30 L 发酵罐水平上达到 3 g/L。在国内,郭良栋等用 *E. coli* C8 发酵生产聚唾液酸,产量为 1.2 g/L^[11]。总体而言,目前聚唾液酸生产仍处于较低的水平,难以满足市场需求。

作者等诱变筛选出一株高产聚唾液酸的生产菌株 *E. coli* CCTCC M208088,并对其培养条件进行了优化,结果发现聚唾液酸合成受环境 pH 的显著影响^[12-14]。在此基础上,比较了几种不同 pH 控制策略对聚唾液酸发酵的影响并对其进行了优化,进一步提升了聚唾液酸的发酵水平。

1 材料与方法

1.1 菌株

E. coli CCTCC M208088;江南大学生化工程与反应器研究室诱变筛选并保藏。

1.2 培养基

1.2.1 种子培养基(g/L) NaCl 5.0,胰蛋白胨 10,牛肉膏 3.0,pH 7.2-7.4(灭菌前)。

1.2.2 发酵培养基(g/L) 山梨醇 40,氯化铵 4.0,磷酸氢二钾 2.5 或 20,MgSO₄ 0.9,胰蛋白胨 1.5,pH 7.8(灭菌前)。除胰蛋白胨为生化试剂外,其他均为分析纯;上海国药集团化学试剂有限公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 培养方法 种子培养:将一环斜面培养物接种至装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中培养,摇床转速 250 r/min,温度 37 °C,培养时间 8~10 h。

发酵罐培养:7 L 发酵罐中添加发酵培养基体积为 4 L,接种量为体积分数 4%,整个发酵过程维持温度为 37°C,通气量 1.5 vvm,搅拌转速为 600 r/min,pH 控制方式根据实验情况决定。

1.3.2 测定方法 取 2 mL 发酵液,10 000 r/min 离心 10 min,吸取 0.5 mL 上清液,其中的山梨醇和氯化铵分别采用高碘酸法^[15]和水杨酸钠比色法^[16]测定,聚唾液酸和磷酸盐分别采用间苯二酚法^[17]和钼酸铵法^[18]测定。沉淀物在 80°C 烘箱中烘干至恒重,称量得菌体干重。

2 结果与分析

2.1 高质量浓度磷酸盐缓冲液 pH 值对聚唾液酸发酵的影响

作者在前期研究中发现,大肠杆菌合成聚唾液酸受到环境 pH 值的显著影响^[13],赵慧等也曾在研究中发现高浓度磷酸盐在聚唾液酸分批发酵中作用主要是缓冲 pH 值^[18]。为进一步揭示 pH 值在聚唾液酸发酵过程的作用,作者研究了不同 pH 值控制策略下的聚唾液酸发酵特性。

目前,国内外报道的聚唾液酸发酵生产过程通常都采用含有较高浓度磷酸盐的培养基^[8,11]。在高质量浓度磷酸盐下(20 g/L),聚唾液酸的发酵过程如图 1 所示。菌体浓度在发酵 8~16 h 之间成指数速率倍增,但是之后增速减缓,最终达到 7.3 g/L;而聚唾液酸合成与菌体生长在整个过程中基本呈偶联态势,最终产量达到 1.9 g/L。底物山梨醇和氯化铵在菌体生长的对数期被快速消耗,氯化铵在 20 h 即被耗尽而只有约 50% 的初始山梨醇被消耗。而高达 20 g/L 的初始磷酸盐最终仅仅被利用了 0.7 g/L,大部分磷酸盐残留在发酵液中。此外,在

12~16 h, pH 迅速从 6.5 降到了 4.0 以下, 与此同时, 菌体生长、聚唾液酸合成以及山梨醇消耗速率显著减缓以至于接近停滞。

以上实验现象表明较高浓度磷酸盐主要作用是缓 pH, 而不是作为主要底物被摄取。在 12 h 以前, 菌体生长相对缓慢, 受其缓冲作用的影响, 环境 pH 变化很微小。此后, 由于菌体的急剧生长, 导致大量酸性代谢产物(有机酸)的分泌, 大大超过了磷

酸盐的缓冲极限, 引起了 pH 值的急剧下降(降至 4.0), 太低的 pH 环境对菌体生长、产物合成以及底物消耗产生显著的抑制作用, 导致菌体代谢行为的停滞。此外, 发酵液中残留的大量磷酸盐(约 19 g/L)会对后续聚唾液酸的提纯处理尤其是季铵盐络合沉淀造成严重干扰, 并且会给废水处理造成不利影响。因此, 在后续的研究中, 作者采取降低磷酸盐用量, 同时流加氢氧化钠溶液控制 pH 的策略。

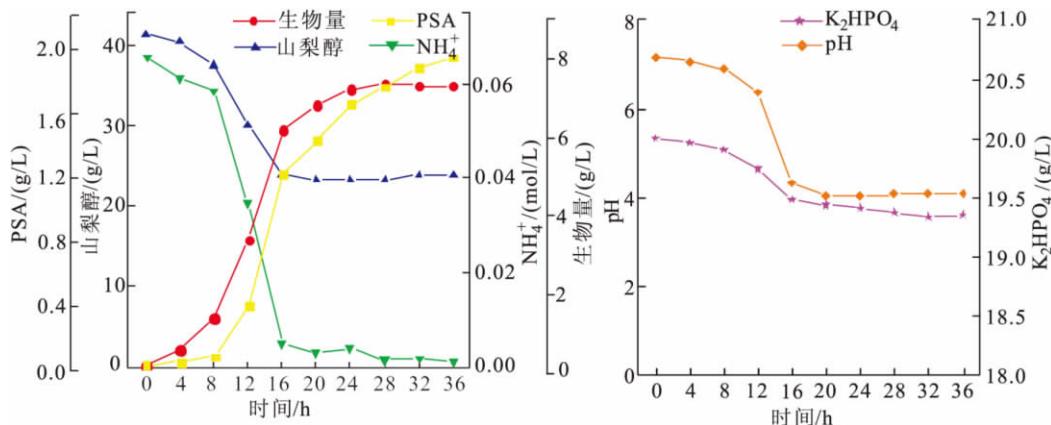


图 1 高浓度磷酸盐条件下聚唾液酸发酵过程曲线

Fig. 1 Polysialic acid fermentation with high-level initial K_2HPO_4 in medium

2.2 氢氧化钠流加控制 pH 值对聚唾液酸发酵的影响 在前期研究中, 作者发现当 pH 值控制在 6.4 时, 菌体合成聚唾液酸的效率最高^[14]。因此在接下来的研究中, 将磷酸盐初始质量浓度降低至 2.5 g/L, 并流加 2 mol/L 的氢氧化钠溶液使 pH 值保持在 6.4 水平上(当 pH 值降至 6.4 时)。发酵过程如

图 2 所示, 聚唾液酸的合成与菌体生长相偶联, 最大菌体质量浓度达到 7.8 g/L, 最高聚唾液酸产量达到 2.3 g/L, 分别比高质量浓度磷酸盐发酵情况下提高了 7% 和 13%。此外, 残留磷酸盐质量浓度从 19.3 g/L 降到了 1.8 g/L, 大大缓解了后期处理的压力。

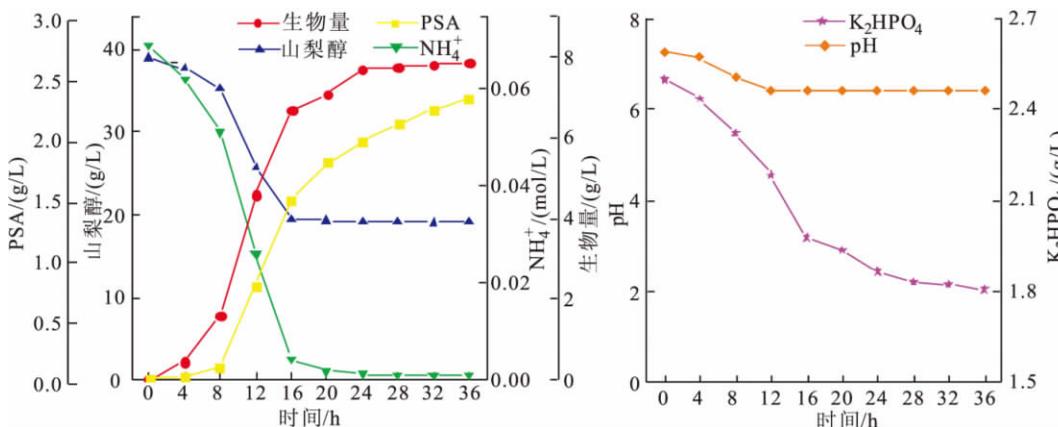


图 2 氢氧化钠控制 pH 值对聚唾液酸发酵的影响

Fig. 2 Effect of using NaOH for pH control on PSA fermentation

另外, 氢氧化钠溶液控制 pH 值发酵条件下的菌体生长和产物合成速率与高质量浓度磷酸盐条件下相比有了明显的提高, 如前者在发酵 12 h, 菌

体和聚唾液酸质量浓度已分别达到将近 5 g/L 和 1.2 g/L, 而相同时刻, 后者的相应质量浓度仅为 3 g/L 和 0.4 g/L。为进一步区别二者的差异, 比较

了两种 pH 控制方式下菌体比生长速率和聚唾液酸比合成速率的动力学过程曲线,如图 3 所示。高浓度磷酸盐发酵条件下的最大比生长速率和产物比合成速率分别为 $0.4, 0.05 \text{ h}^{-1}$, 相比之下,氢氧化钠控制 pH 方式下的最大比生长速率和产物必合成

速率则达到 $0.5, 0.07 \text{ h}^{-1}$, 比前者分别提高了 25% 和 40%。因此,可以认为高质量浓度的初始磷酸盐对菌体生长和产物合成产生了抑制作用,而氢氧化钠控制 pH 的低盐发酵策略一定程度上消除了这一不利影响。

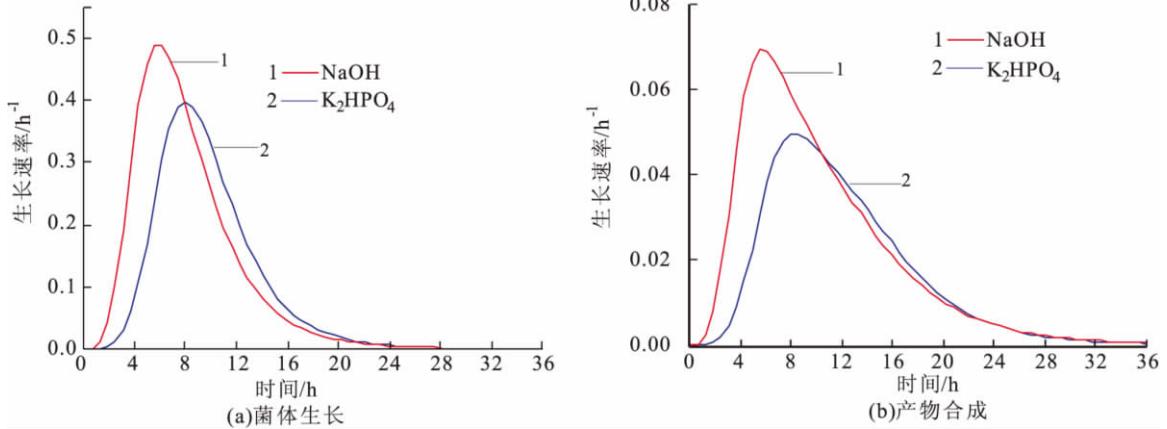


图 3 不同 pH 值控制策略对菌体生长和产物合成的影响

Fig. 3 Effect various pH control strategy on the cell growth and PSA synthesis

值得注意的是,如图 2 所示,当发酵进行至 16 h,尽管 pH 依然保持在 6.4 水平上,但是氯化铵已消耗殆尽,导致了菌体生长和山梨醇消耗的停滞。由于聚唾液酸合成和菌体生长是紧密偶联的,氮源耗尽引起菌体生长中止,进而影响了聚唾液酸的合成。为了控制 pH 在合适水平上,同时保证聚唾液酸发酵过程中足够的氮源供给,尝试了氨水流加控制 pH 的策略。

2.3 氨水流加控制 pH 值对聚唾液酸发酵的影响

通过氨水流加使 pH 值保持在 6.4 的水平上,发酵过程曲线如图 4 所示。 NH_4^+ 在整个过程中大致维持在 $0.04 \sim 0.06 \text{ mol/L}$, 充足的氮源供给促使了菌体浓度的大幅增长,最大菌体浓度达到了 12.5 g/L , 而菌体的快速繁殖导致 40 g/L 山梨醇在 20 h 即被耗尽,聚唾液酸最终产量为 3.2 g/L , 与氢氧化钠控制策略下的 2.3 g/L 产量相比,提高了 39%。Honda 等在研究中发现,维持合适的 NH_4^+ 水平对大肠杆菌发酵生产聚唾液酸至关重要,并引进了 FIA(Flow injection analysis) 系统来监测和控制发酵过程中 NH_4^+ 的供给水平,从而大大提高了聚唾液酸的产量^[19]。与氢氧化钠相比,氨水流加控制 pH 的优势在于它不仅可以让 pH 保持在设定的水平上,还能够使 NH_4^+ 浓度维持在适宜的范围内,这极大的促进了菌体生长和产物的合成。与此同时,

菌体浓度的大幅增加加剧了其对山梨醇的消耗, 40 g/L 的初始山梨醇在发酵中期即被耗尽。因此,在采取流加氨水控制 pH 的策略时,山梨醇成为进一步提升聚唾液酸生产水平的限制因素。

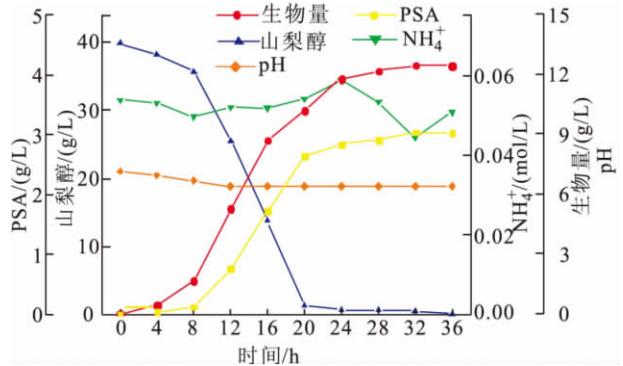


图 4 氨水流加控制 pH 值对聚唾液酸发酵的影响

Fig. 4 Effect of using ammonia water for pH control on PSA fermentation

山梨醇属于一种具有高渗透性特质的糖类原料,高浓度山梨醇伴随的高渗透压对于菌体的生长往往是不利的;李文强等在研究大肠杆菌发酵生产聚唾液酸的过程中发现:当山梨醇质量浓度高于 20 g/L 时,菌体生长会受到明显的抑制^[20]。基于此,在接下来的研究中,将山梨醇初始质量浓度从 40 g/L 降到了 20 g/L ,并在发酵过程中采取低速流加山梨醇的方式来进一步提高聚唾液酸的生产水平。

2.4 山梨醇流加对氨水控制 pH 值的聚唾液酸发酵过程的影响

利用氨水控制 pH 值的同时实施山梨醇流加策略,发酵过程如图 5 所示。发酵初始山梨醇的质量浓度为 20 g/L,从 8 h 开始,以相当于 3.3 g/(L·h)的恒定速率向发酵体系中流加山梨醇溶液,整个流加过程共持续 12 h。发酵终止时,山梨醇残留质量浓度小于 5 g/L,而最大菌体质量浓度则增至 17.5 g/L,聚唾液酸产量也达到了 4.8 g/L。发酵过程中维持较低水平的山梨醇浓度,有利于解除高渗透压对于菌体生长的抑制。在整个发酵过程中,pH 都保持在 6.4 水平上,NH₄⁺ 则保持在 0.04~0.06 mol/L 范围内,而山梨醇质量浓度始终处于 20 g/L 以下。通过采取氨水控制 pH 结合山梨醇流加的策略,使得 pH、NH₄⁺ 以及山梨醇均处于适宜水平,结果导致菌体和聚唾液酸浓度的大幅提升,两者分别比未优化前(高浓度磷酸盐发酵方式)提高了 143%和 152%。因此,将 pH、NH₄⁺ 和山梨醇保持在适宜水平是聚唾液酸发酵调控的关键所在。

2.5 不同 pH 值控制策略对聚唾液酸发酵影响的比较

进一步对不同 pH 控制策略下的聚唾液酸发酵参数进行了比较,结果如表 1 所示。随着 pH 值控制策略的逐步优化,聚唾液酸产量和生产强度从优

化前的 1.9 g/L 和 0.05 g/(L·h) 提高到 4.8 g/L 和 0.16 g/(L·h),分别提高了 152%和 188%。

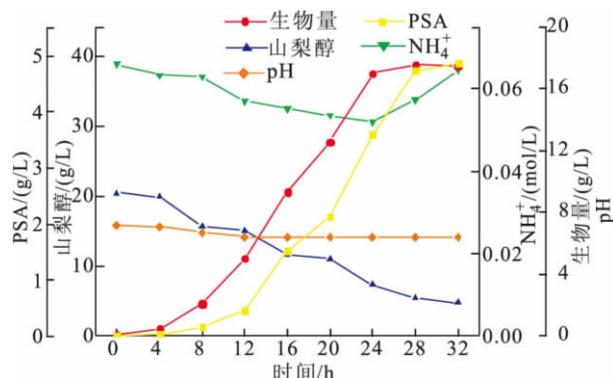


图 5 山梨醇流加对氨水控制 pH 值的聚唾液酸发酵过程的影响

Fig. 5 Effect of sorbitol feeding on PSA fermentation with pH control by ammonia water

与此同时,菌体质量浓度也从 7.2 g/L 大幅提高到 17.5 g/L,提高了 140%。但是,出乎意料的是聚唾液酸产率 Y_{P/S} 却随着菌体和聚唾液酸水平的提高而呈现下降趋势。这可能是发酵过程中菌体生长与聚唾液酸合成竞争底物山梨醇的结果。在大肠杆菌合成聚唾液酸过程中,由山梨醇转化生成的 UDP-GlcNAc 既是合成聚唾液酸的关键前体物质,又是合成细胞膜和细胞壁主要元件脂多糖和肽聚糖的前提物质。

表 1 不同 pH 值控制策略下的聚唾液酸发酵参数的比较

Tab. 1 Parameters of PSA fermentation with different pH control strategy

pH 值	Maximum PSA/(g/L)	Maximum Biomass/(g/L)	PSA productivity / (g/(L·h))	Y _{P/X} /(g/g)	Y _{P/S} /(g/g)
pH control by 20 g/L K ₂ HPO ₄	1.9	7.2	0.05	0.27	0.12
pH control by NaOH	2.3	7.8	0.06	0.29	0.13
pH control by ammonia water	3.2	12.5	0.09	0.26	0.08
pH control by ammonia water*	4.8	17.5	0.16	0.28	0.09

* pH control by ammonia water coupled with sorbitol feeding

3 结语

在发酵培养基中加入高质量浓度磷酸盐(20 g/L 磷酸氢二钾)缓冲 pH 值,可使聚唾液酸产量达到 1.9 g/L,但大部分未消耗的磷酸盐残留在发酵液中,严重影响聚唾液酸后期纯化处理。为此降低培

养基中磷酸盐的质量浓度至 2.5 g/L,并采取流加氢氧化钠溶液控制 pH,聚唾液酸产量提升至 2.3 g/L,但是这种发酵方式使得 NH₄⁺ 在发酵前期 16 h 即被耗尽。为解除发酵过程中氮源匮乏的限制,采取氨水流加控制 pH 的策略,这大大刺激了菌体的生长,导致 40 g/L 山梨醇在发酵中期消耗殆尽。

为进一步提升聚唾液酸的生产水平,在氨水控制 pH 的同时,向发酵体系中流加补充山梨醇,结果聚唾液酸产量和生产强度分别达到了 4.8 g/L 和 0.16 g/(L·h),比优化前(高浓度磷酸盐发酵)分

别提高了 152% 和 188%。综上所述,在聚唾液酸发酵过程中,采取相应的 pH 控制策略,将 pH、NH₄⁺ 和山梨醇维持在适宜水平上,是实现聚唾液酸高效生产的重要前提。

参考文献(References):

- [1] Angata T, Varki A. Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids; an evolutionary perspective[J]. **Chem Rev**, 2002, 102: 439-469.
- [2] Wunder D E, Aaronson W, Hayes S F, et al. Nucleotide sequence and mutational analysis of the gene encoding KpsD, a periplasmic protein involved in transport of polysialic acid in *Escherichia coli* K1[J]. **J Bacteriol**, 1994, 176: 4025-4033.
- [3] Gregoriadis G, Jain S, Papaioannous I, et al. Improving the therapeutic efficacy of peptides and proteins: A role for polysialic acids[J]. **Int J Pharm**, 2005, 300: 125-130.
- [4] Bruns S, Stark Y, Wieland M, et al. Fast and efficient screening system for new biomaterials in tissue engineering; a model for peripheral nerve regeneration[J]. **J Biomed Mater Res**, 2007, 81A: 736-747.
- [5] Stark Y, Bruns S, Stahl F, et al. A study on polysialic acid as a biomaterial for cell culture applications[J]. **J Biomed Mater Res**, 2007, 85: 1-13.
- [6] Witczak ZJ, Nieforth KA. Carbohydrate in Drugs Design[C]. New York: Marcel Dekker, 1997: 82-134.
- [7] McNicholl IR, McNicholl JJ. Neuraminidase inhibitors; zanamivir and oseltamivir[J]. **Ann Pharmacother**, 2001, 35: 57-70.
- [8] Rodriguez-Aparicio LB, Reglero A, Ortiz AI, et al. Effect of physical and chemical conditions on the production of colominic acid by *Escherichia coli* in a defined medium[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 1988, 27: 474-483.
- [9] Rode B, Endres C, Ran C, et al. Large-scale production and homogenous purification of long chain polysialic acids from *E. coli* K1[J]. **J Biotechnol**, 2008, 135: 202-209.
- [10] Kapre SV, Shaligram U. Process for the preparation of highly pure polysialic acid of high molecular weights; PCT Int [P]. Patent Application WO 2008035373. 2008-03-27.
- [11] Guo LD, Qian SJ, Ye J, et al. Studies on the selection of strains producing colominic acid and culture conditions[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 1998, 38(2): 103-107.
- [12] 于军华, 詹晓北, 朱莉, 等. 聚唾液酸的摇瓶工艺[J]. 无锡轻工大学学报, 2002, 21(6): 583-587.
YU Jun-hua, ZHAN Xiao-bei, ZHU Li, et al. Conditions for polysialic acid production in shaking flask[J]. **Journal of University of Light Industry**, 2002, 21(6): 583-587. (in Chinese)
- [13] 詹晓北, 郑志永, 朱莉, 等. pH 值对聚唾液酸分批发酵的影响及补料发酵[J]. 无锡轻工大学学报, 2001, 20(3): 223-227.
ZHAN Xiao-bei, ZHENG Zhi-yong, ZHU Li, et al. pH control in batch and fed-batch cultivation for polysialic acid production[J]. **Journal of University of Light Industry**, 2001, 20(3): 223-227. (in Chinese)
- [14] Zhan X B, Zhu L, Wu J R, et al. Production of polysialic acid from fed-batch fermentation with pH control[J]. **Biochem Eng J**, 2002, 11: 201-204.
- [15] Pesze M, Bartos J. Colorimetric and Fluorometric Analysis of Organic Compounds and Drugs[M]. New York: Marcel Dekker, 1974: 291-328.
- [16] Harwood J E, Huysen D J. Automated analysis of ammonia in water[J]. **Water Res**, 1970, 4: 695-704.
- [17] Svennerholm L. Quantitative estimation of sialic acids[J]. **Biochim Biophys Acta**, 1957, 24: 604-611.
- [18] 赵慧. 聚唾液酸发酵和唾液酸提取的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2004.
- [19] Honda H, Nakazeko T, Ogiso K, et al. Colominic acid production from *Escherichia coli* in a fed-batch culture under the control of ammonium ions using an FIA System[J]. **J Ferment Bioeng**, 1997, 83: 59-63.
- [20] 李文强. 唾液酸发酵控制及其分离纯化的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2005.