

pH 调控方式和温度对透明质酸发酵过程的影响

汪伟, 蔡海波, 谭文松

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

摘要: 本文以一株产透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 的兽疫链球菌为研究对象, 在 5.00 L 发酵罐和 250 mL 摇瓶中考察了温度和 pH 对 HA 发酵过程中菌体生长、HA 产量、HA 分子量大小以及分布的影响。结果显示, 当 pH 为 7.00 时适合菌体生长, 而在产物合成阶段更高的 pH 条件 8.00 下 HA 比生成速率更高。据此, 设计了分段和周期性改变发酵过程 pH 的调控模式, 研究表明: 分段 pH 调控方式与 pH 为 7.00 时相比 HA 浓度没有提高, 但是 pH 在 7.00 和 8.00 之间进行分段调节时分子量提高了 10.60%, 同时显著降低了多分散系数, 另外在 pH 在 7.00 和 8.00 之间进行分段调节的同时在 33 °C 的培养温度下收获时 HA 分子量提高了 18.70%, 而为后续工业化生产分子量更为集中的 HA, 同时降低不同分子量 HA 分离成本提供了方向。

关键词: 透明质酸; 兽疫链球菌; 温度; pH

文章编号: 1673-9078(2019)08-207-213

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.8.030

Effects of pH Control Modes on Hyaluronic Acid Fermentation Process

WANG Wei, CAI Hai-Bo, TAN Wen-song

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: In this work, the microorganism concentration, HA yield, HA molecular weight and molecular weight distribution of hyaluronic acid (HA) were analyzed at different pH and temperature in 5 L bioreactor and 250 mL shake flask. It was found that the best pH for bacteria growth and HA production was 7.00, but under HA synthesis stage, HA generation rate was higher at higher pH condition 8.00. Two regulation styles, the periodic control mode and subsection control mode were designed. The results were as follows: the periodic control mode had no effect to HA yield and HA molecular weight, subsection control mode had no effect to HA yield, but could improve the molecular weight by 10.60% and significantly reduced the dispersion coefficient, and at periodic control mode when culture temperature was 33 °C, HA molecular weight when harvested was 18.70% higher than temperature 37 °C. These results could provide directions for subsequent industrialization production molecular weight concentrated HA and reducing the separation cost of HA with different molecular weights.

Keywords: hyaluronic acid (HA); *Streptococcus zooepidemicus*; temperature; pH

透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 是一种具有特殊的分子结构和物理化学性质的高分子酸性粘多糖, 作为一种保湿剂具有广泛的应用价值。而其分子量的大小直接关系到其应用范围。通常情况下, 分子量大于 2.00×10^6 u 的 HA 可用于医疗行业; 而分子量处于 1.00×10^5 u 的 HA 属于低分子, 易分解, 可用于食品和化妆品行业^[1]。

用微生物发酵法生产 HA 过程中, pH 是细胞生长和产物合成的重要环境参数, 是代谢活动的综合指标。Kim 等^[2]人在研究马链球菌 KFCC 10830 发酵合成 HA 的过程中, 发现在 37 °C 下, pH 值为 7.00 时,

收稿日期: 2019-04-03

作者简介: 汪伟 (1986-), 男, 工程师, 研究方向: 工业微生物

通讯作者: 蔡海波 (1965-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 干细胞与组织工程; 共同通讯作者: 谭文松 (1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 动物

细胞与组织工程

HA 的产量和分子量都达到最大, 分别可达到 5.50 g/L 和 3.80×10^6 u; 而当 pH 值为 9.00 时, 菌体就会停止生长, HA 产量极低。Johns 等^[3]人采用兽疫链球菌 ATCC 35246 发现在厌氧培养条件下最适合菌体生长和 HA 合成的 pH 为 6.70 ± 0.2 , 此时 HA 产量为 1.60 g/L。Hiruta 等人采用 Maxblend 反应器研究 pH 对兽疫链球菌 M-8254 的影响时发现, pH 为 6.50 时有利于菌体的生长, 而 pH 为 6.80 时则有利于 HA 的合成, 此条件下发酵 50.00 h 时的 HA 浓度约 pH 6.50 时的 2 倍^[4]。刘龙等^[5]人在研究兽疫链球菌 WSH-24 发酵过程中, 从指数生长中期开始采用将 pH 从 7.00 到 8.50 进行周期性改变的控制模式, 使得 HA 的产量由恒定控制 pH 为 7.00 时的 5.00 g/L 提高到 6.50 g/L, 进一步分析发现 HA 产量提高的原因是菌体内乳酸激酶酶活性下降, 使得副产物乳酸的生成减少, 而促进细胞能量合成代谢的 NADH 酶和乙酸激酶活性提高。Armstrong

等^[6]人研究了兽疫链球菌菌种 ATCC 35246 菌种, 当 pH 控制在 6.30 到 8.00 之间使对 HA 分子量大小的影响较小, 基本上分布在 $1.50 \times 10^6 \sim 2.30 \times 10^6$ u 的范围内。

温度也是影响微生物生长和产物合成的重要因素之一, Kim^[2]等人采用 *Streptococcus equi* KFCC 10830 的研究结果表明, HA 发酵的最适温度是 37 °C, 此时 HA 产量和分子量均达到最大值, 当温度低于 37 °C 时, HA 分子量将会出现较大幅度的降低。而 Armstrong 和 Johns^[6]通过考察 *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 在 32~42 °C 温度范围内 HA 的分子量的差异发现, 低温更有利于 HA 产量和分子量的提高。另外, 高海军和 Kim 等^[7,8]人的实验也得出了 Armstrong 和 Johns 所报道的结论。吴华昌^[9]等人采用兽疫链球菌原始菌株研究了 30~40 °C 范围内 HA 分批发酵过程, 发现最适的细胞生长温度是 34 °C, 而 40 °C 时 HA 的产量最高。可见, 发酵过程中 pH 和温度的控制不仅影响 HA 的合成而且其影响的结果随菌种而异。为此, 本文以本实验室保藏的一株兽疫链球菌为对象, 尝试在发酵过程中周期性或者分段性改变培养环境 pH, 或者改变发酵过程温度, 调控菌种的生长代谢, 以期提高 HA 的产量和分子量, 为优化透明质酸生产过程提供技术支持。

1 材料与方 法

1.1 菌株和培养基

兽疫链球菌 *S.zooepidemicus* G1 (实验室保藏号), 该菌株是出发菌株 *S.zooepidemicus* ATCC 39920 基础上经过紫外线和亚硝基胍复合诱变所得, 为溶血素和 HA 裂解酶双缺陷型菌株。

种子培养基: 2.00 g/L 葡萄糖, 10.00 g/L 牛肉浸膏, 20.00 g/L 聚蛋白胨, 5.00 g/L 酵母提取物, 2.00 g/L NaCl, 1.00 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.12 g/L KH_2PO_4 , pH 7.00~7.20, 121 °C 灭菌 30 min。

发酵培养基: 50.00 g/L 葡萄糖, 20.00 g/L 聚蛋白胨, 10.00 g/L 酵母提取, 1.00 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.50 g/L K_2HPO_4 , 2.00 g/L NaCl, pH 7.00~7.20, 121 °C 灭菌 30 min。

1.2 主要仪器设备

5 L 全自动发酵罐 (Biorea 22000), 上海伯瑞生物技术发展有限公司; 紫外可见分光光度计 (752 N), 上海棱光技术有限公司; 乌式黏度计 (0.5~0.6 mm), 上海人和科学仪器有限公司; 回转式恒温调速摇床

(HYG-II), 上海新型自动化控制设备成套厂; 超净工作台 (SHJ2LP), 上海净化设备厂; 电子天平 (FA1004N), 上海精密科学仪器有限公司; 多角度激光散射仪 (DAWN-DSP), 美国怀亚特公司。

1.3 培养和测定方法

发酵培养方法: 采用 5.00 L 发酵罐培养, 其装液量为 3.50 L, 发酵温度为 37 °C, 通气量 6.00 L/min, 用 5.00 mol/L 的 NaOH 溶液控制 pH 在一定值。初始搅拌转速为 150 r/min, 并根据溶氧浓度变化逐步提高搅拌转速, 以保证发酵过程中溶氧水平不低于 30%。

HA 浓度测定: 采用 Bitter-Muir 的吡啶法^[10]。

细胞浓度检测方法: 采用比浊法测定, 将发酵液稀释到一定程度, 以蒸馏水为空白对照, 用分光光度计测定菌体在 660 nm 波长下的吸光度, 然后再乘以稀释倍数, 就是 OD_{660} 。

细胞干重 (DCW) 的测定: 将发酵液稀释一定倍数然后离心, 收集菌体并用蒸馏水清洗 2 次, 105 °C 条件下烘干至恒重。

HA 分子量测定: 采用 Laurent 的特性粘度法^[11,12]。

HA 分子量分布及多分散指数测定: 采用多角度激光光散射仪与尺寸排阻色谱法联用。

HA 合成酶活性 (has A 基因编码) 测定: 采用 Yu 的方法进行测定^[13]。分别取的发酵 6.00、7.00、8.00 h 时 5.00 mL, 在 4 °C 下 12000 r/min 离心 30 min。然后弃掉上清, 加入 20.00 mL 磷酸盐缓冲液混合充分, 超声破碎 50 min。取 0.50 mL 细胞裂解液, 建立酶反应体系 (0.5 mL 细胞裂解液, 4 mM UDP-GlcA 250 μL , 4 mM UDP-GlcNAc 250 μL , 1 M MgCl_2 10 μL , 0.1 M DTT 10 μL), 37 °C 水浴反应 2.00 h。而后放入沸水浴中 2 min 中止反应, 将其冷却至室温。加入 1 mL 0.1% SDS 混合, 4000 r/min 离心 10 min, 按照上述测定 HA 含量的方法进行测定。酶活单位定义为每克干菌体裂解物每小时催化合成的 HA 的毫克数。

1.4 过程参数计算

HA 比合成速率:

$$Q_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad (1)$$

$$Q_p = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \frac{dP}{dX} = \mu \frac{dP}{dX} \quad (2)$$

$$Q_p dX = \mu dP \quad (3)$$

$$\int_{X_1}^{X_2} Q_p dX = \int_{P_1}^{P_2} \mu dP \quad (4)$$

$$Q_p (X_2 - X_1) = \mu (P_2 - P_1) \quad (5)$$

$$Q_p = \frac{\mu(P_2 - P_1)}{(X_2 - X_1)} \quad (6)$$

其中: Q_p : 产物比合成速率, $g/(cell \cdot L)$; X : 菌体湿重, g/L ; P : HA 产量, g/L ; t : 培养时间, h 。

1.5 统计分析

采用 Origin pro 9.0 统计分析软件进行方差分析, 实验数据以 $mean \pm SD$ 表示, 组件比较采用 One-way ANOVA 分析, $p < 0.05$ 位差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 pH 值对发酵过程的影响

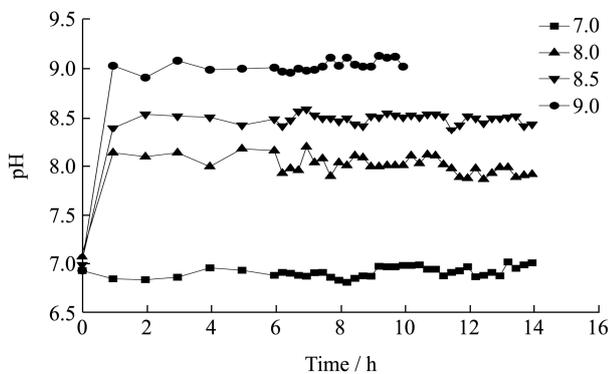


图 1 HA 发酵过程中 pH 随时间的变化

Fig.1 The change of pH during HA fermentation

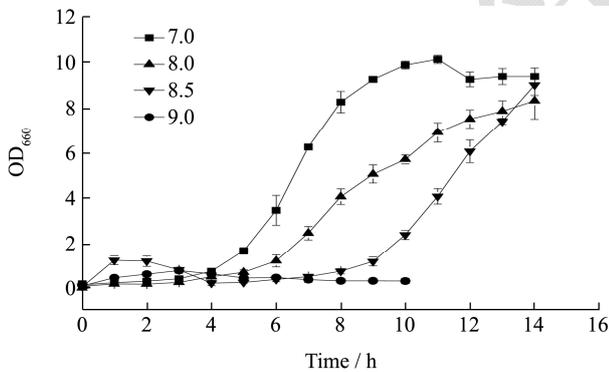


图 2 pH 对菌体生长的影响

Fig.2 Effect of pH on biomass growth during HA fermentation

pH 对微生物的生长和产物合成有重要的影响。在 HA 的发酵过程中, 鉴于菌体生长与产物合成对环境 pH 的要求不同, 不同的 pH 控制模式会影响发酵过程透明质酸的产量及其分子量。本节在考察了 pH 对 HA 发酵过程影响的基础上, 确定了适合菌体生长和产物合成的最适 pH, 据此, 设计了分段和周期调节 pH 的控制模式。分段调节 pH 的模式为发酵前 6 h, 维持 pH 为 7.00, 之后分别控制过程的 pH 为 8.00、8.50 或 9.00, 直到发酵结束; 而周期性调节 pH 的模式为发酵前 6.00 h, pH 保持为 7.00, 之后每隔 1 h 调节 pH 在 7.00 和

8.00、8.50 或 9.00 之间做周期性改变, 直至发酵结束。通过分析各条件下菌体生长以及产物合成的动力学参数, 考察了 pH 控制模式对 HA 产量和分子量的影响, 为优化发酵过程提供了依据。

图 1 为培养液的 pH 随时间的变化趋势。在发酵过程中分别将 pH 控制在 7.00、8.00、8.50 以及 9.00 附近, 为确保 pH 控制的精确性, 第 0~6 h 每隔 1 h 离线检测一次 pH, 6~14 h 每隔 0.25 h 离线检测一次 pH, 保证培养过程中发酵液的 pH 维持在设定值 ± 0.20 。

pH 为 7.00、8.00、8.50 以及 9.00 条件下的菌体生长曲线如图 2 所示。pH 为 7.00 的条件下最适于本细菌的生长, 随着 pH 的升高菌株延迟期越来越长; 当 pH 达到 9.00 时菌株几乎不生长。

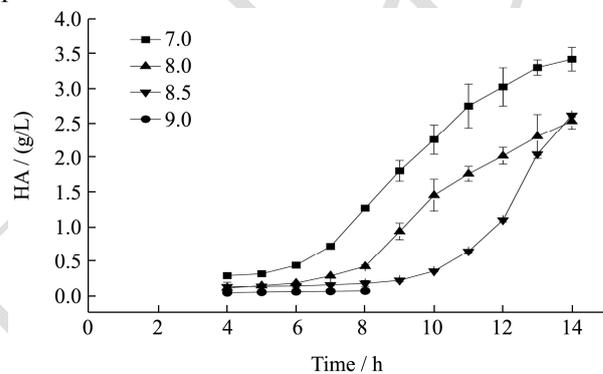


图 3 pH 对 HA 产量的影响

Fig.3 Effect of pH on HA production during HA fermentation

图 3 为 pH 为 7.00、8.00、8.50 和 9.00 的条件下发酵液中 HA 浓度随时间的变化。可以看出, 随着 pH 的升高, 发酵液中 HA 浓度降低。pH 为 7.00 时, 发酵结束时发酵液中 HA 浓度为 3.43 g/L; pH 为 8.00 和 8.50 时, 发酵结束时发酵液中 HA 浓度仅为 2.54 g/L 和 2.63 g/L, 而当 pH 为 9.00 时, 仅为 0.076 g/L, 这三种条件下 HA 浓度都低于 pH 为 7.00 时的条件。

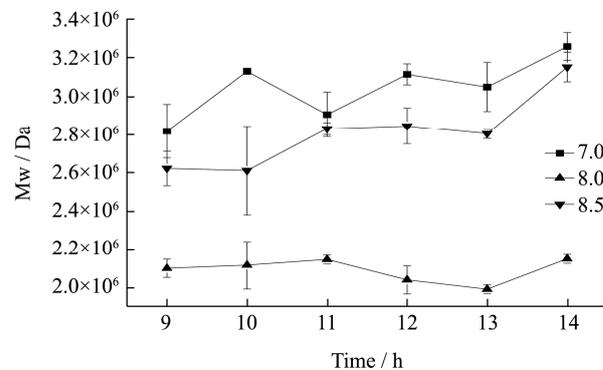


图 4 pH 对 HA 分子量的影响

Fig.4 Effect of pH on molecular weight during HA fermentation

图 4 为 pH 在 7.00、8.00、8.50 和 9.00 条件时 HA 分子量随时间的变化。pH 为 8.50 和 7.00 时, 发酵结束时 HA 分子量相近, 分别为 3.15×10^6 u 和 3.26×10^6 u。

当发酵过程 pH 为 8.00 时, 发酵结束时 HA 分子量约为 2.10×10^6 u, 当 pH 为 9.00 时, HA 分子量很小, 难以用常规的乌氏粘度计检测, 这两种条件都比 pH 为 7.0 时差别较大。

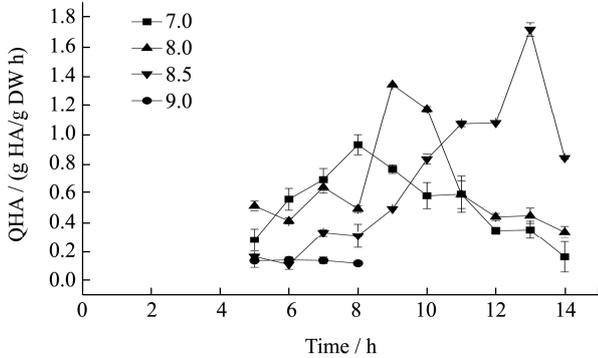


图5 pH 对 HA 比生成速率的影响

Fig.5 Effect of pH on specific rates of HA production during HA fermentation

图 5 为 pH 为 7.00、8.00、8.50 和 9.00 的条件下 HA 比生成速率随时间的变化。pH 为 7.00、8.00 和 8.50 时 HA 的比生成速率都是先增大后减小, pH 越低, 比生成速率达到最大值所需要的时间越短。在 6~8 h 内 pH 为 7.00 的条件 HA 比生成速率高于其他条件, 而 pH 为 8.0 的条件在第 9~10 h 内, 以及 pH 为 8.5 条件在 10~14 h 内均高于 pH 为 7.00 条件的 HA 比生成速率。而 pH 为 9.00 时比生成速率在很低的水平, 变化不大。由此可见 pH 为 8.00 和 8.50 的条件相对 pH 为 7.00 时更有利于 HA 的合成。

HA 合成酶是 has 合成过程中关键酶中最重要的酶, 关系到 HA 的合成及分子量。取各 pH 条件下发酵至对数生长期 6.00 h、7.00 h 和 8.00 h 的样品进行酶活检测, 结果取这 3.00 h 的样品 HA 合成酶活性的平均值。

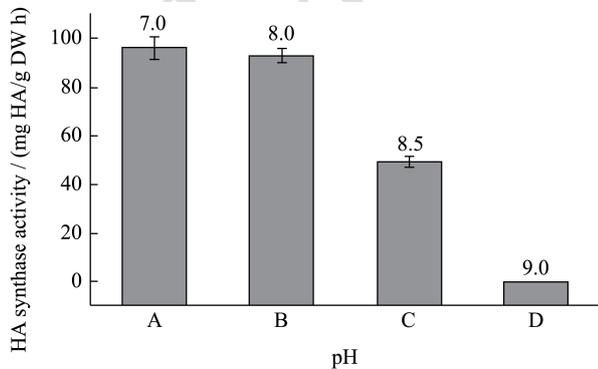


图6 pH 对 HA 合成酶活性的影响

Fig.6 Effect of pH on HA synthase activity

图 6 比较了 pH 在 7.00、8.00、8.50 和 9.00 的条件下菌体内 HA 合成酶活性差异。从图中可以看出 pH 为 8.00 时菌体内 HA 合成酶活性与 pH 为 7.00

时 HA 合成酶活性相差不多, 而 pH 为 8.50 时 HA 合成酶活性仅为 pH 为 7.00 时的一半, 到 pH 为 9.00 时未检测到 HA 合成酶活性。由此可见, 在本实验范围之内, 随着 pH 的升高, HA 合成酶的活性会降低, 在发酵前期 pH 为 7.00 时对 HA 合成是最有利的。

综合对发酵过程中关于兽疫链球菌生长的参数如 OD 值、菌体比生长速率、葡萄糖浓度、葡萄糖比消耗速率以及关于 HA 合成的参数如 HA 产量、HA 分子量、HA 比生成速率以及 HA 合成酶活性的分析, 可以发现对于菌体生长, pH 为 8.00、8.50 甚至 9.00 时与 pH 为 7.00 时相比菌株的生长被抑制, 菌体延迟期增长, 生长速率低, 葡萄糖消耗量减少, 比消耗速率低, 故最适菌体生长的 pH 为 7.00; 从产物合成来看, pH 为 8.00 和 8.50 时 HA 比生成速率比 pH 为 7.00 时更高, 故适合产物合成的 pH 为 8.00 和 8.50, 另外 pH 为 7.00 和 8.50 时发酵过程中的分子量比 pH 为 8.00 时的高, 故要获得高分子量的 HA, 最适的 pH 为 7.00 和 8.50。

2.2 pH 调控模式对产物生成的影响

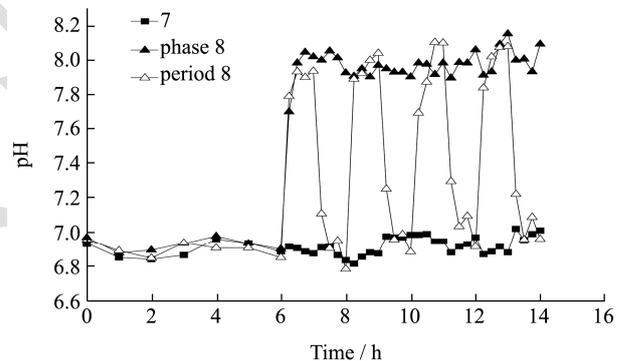


图7 pH 调控模式 1

Fig.7 Effect of pH control strategy 1 on HA concentration during HA fermentation

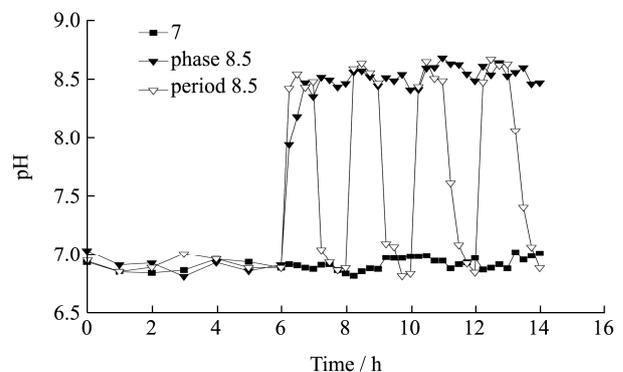


图8 pH 调控模式 2

Fig.8 Effect of pH control strategy 2 on HA concentration during HA fermentation

鉴于前期 pH 为 7.00 时对细胞生长更有利, 在生

长中期后通过调高 pH 的方式可能对分子量和产量会有一定程度的提高, 因此设计了 pH 分段和周期调节模式。如图 5, 分段调节 pH 的模式为发酵前 6 h, 维持 pH 为 7.00, 之后控制过程的 pH 为 8.00 或 8.50 直到发酵结束; 而周期性调节 pH 的模式为发酵前 6.00 h, pH 保持为 7.00, 之后每隔 1 h 调节 pH 在 7.00 和 8.00 或 8.50 之间做周期性改变, 直至发酵结束。图 7 和图 8 为 pH 为 7.00 和分段及周期式调节 pH 为 8.00 或 8.50 时 pH 的变化过程。

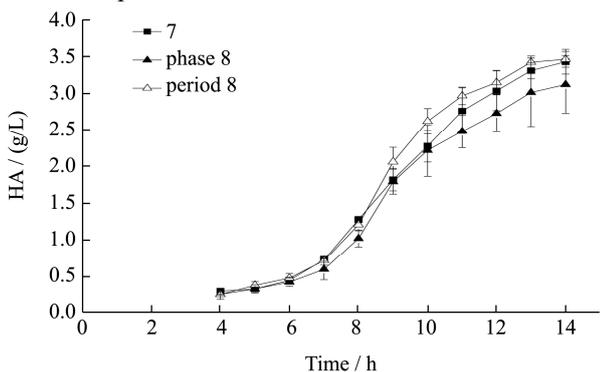


图 9 pH 调控模式 1 对 HA 产量的的影响

Fig.9 Effect of pH control strategy 1 on HA concentration during HA fermentation

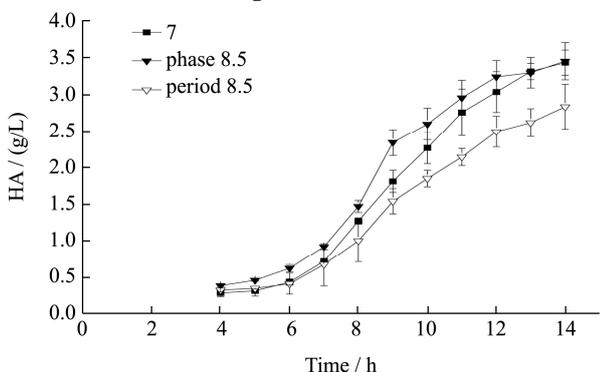


图 10 pH 调控模式 2 对 HA 产量的的影响

Fig.10 Effect of pH control strategy 2 on HA concentration during HA fermentation

图 9 和图 10 为分段和周期 pH 调控模式时发酵过程中 HA 浓度随时间的变化。可以看出图 9 中 pH 在 7.00 与 8.00 之间进行分段和周期性调节模式和图 10 中 pH 在 7.00 和 8.50 之间进行分段调控模式与 pH 为 7.00 时的发酵过程中相似, HA 浓度在第 13 h, 14 h 时达到最大且较为接近, 都为 3.00 g/L 以上。而图 10 中 pH 在 7.00 和 8.50 之间进行周期性调控模式下发酵液中最终 HA 浓度为 2.83 g/L。

图 11 和 12 为分段和周期 pH 调控模式时发酵过程中 HA 分子量随时间的变化。图 11 中 pH 在 7.00 与 8.00 之间的分段调节模式下的分子量最终为 3.60×10^6 u, 比 pH 为 7.0 时的 3.26×10^6 u 高 10.59%,

且从第 11 h 开始到第 14.00 h 结束分子量有较大幅度的提高。pH 在 7.00 与 8.00 之间的周期性调节模式下最终分子量为 3.19×10^6 u, 与 pH 为 7.00 的条件相比比较接近。从图 12 中可以看出发酵结束时发酵液中 HA 分子量都比 pH 为 7.00 时的 HA 分子量相比有一定程度上的下降。

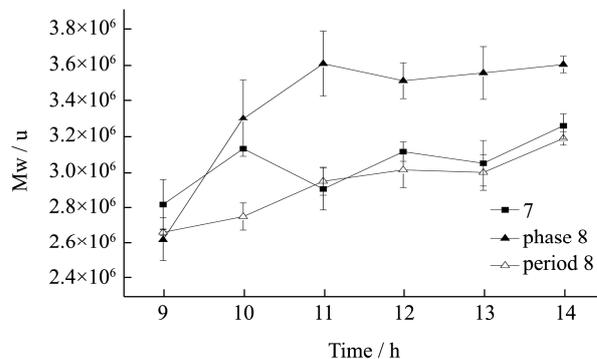


图 11 pH 调控模式 1 对 HA 分子量的的影响

Fig.11 Effect of pH control strategy 1 on HA molecular weight during HA fermentation

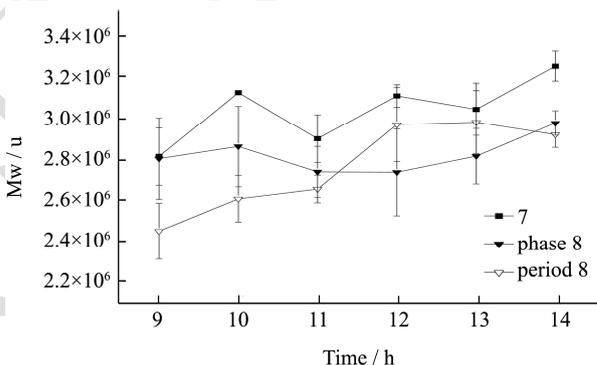


图 12 pH 调控模式 2 对 HA 分子量的的影响

Fig.12 Effect of pH control strategy 2 on HA molecular weight during HA fermentation

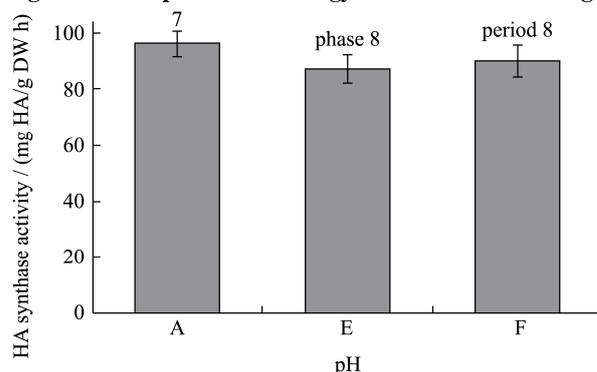


图 13 pH 调控模式 1 对 HA 合成酶活性的的影响

Fig.13 Effect of pH control strategy 1 on HA synthase activity

图 13 和 14 为分段 pH 和周期 pH 调控模式时发酵过程中 HA 合成酶活性。可以看出图 13 中 pH 在 7.00 与 8.00 之间进行分段和周期性调节模式以及图 14 中 pH 在 7.00 和 8.50 之间进行周期性调控模式与 pH

为 7.00 时的发酵过程中菌体内 HA 合成酶活性相差不大。图 14 中 pH 子 7.00 与 8.50 之间改变的分段调控模式使菌体内 HA 合成酶活性下降到 64.00 mg HA/(g DW·h)。

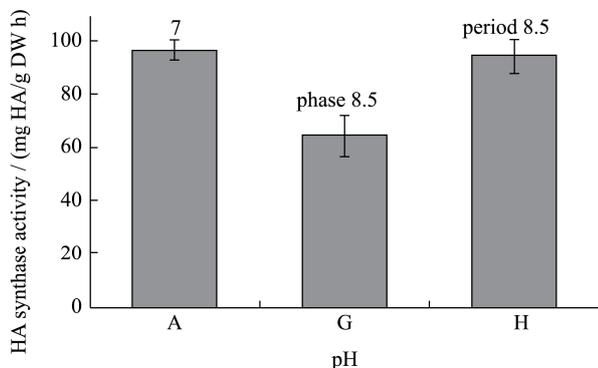


图 14 pH 调控模式 2 对 HA 合成酶活性的的影响

Fig.14 Effect of pH control strategy 2 on HA synthase activity

2.3 pH 调控模式对 HA 分子量分布的影响

由于乌氏粘度计检测的 HA 分子量是发酵过程产

表 1 HA 分子量分布和多分散度

Table 1 Molecular weight distribution of HA and polydispersion index

Polydispersity	Molecular weight distribution/%								
	2.2×10 ⁵ ~5×10 ⁵ u	5×10 ⁵ ~10×10 ⁵ u	10×10 ⁵ ~15×10 ⁵ u	15×10 ⁵ ~20×10 ⁵ u	20×10 ⁵ ~25×10 ⁵ u	25×10 ⁵ ~30×10 ⁵ u	30×10 ⁵ ~60×10 ⁵ u	60×10 ⁵ ~100×10 ⁵ u	
pH 7.0	1.84	3.16	10.37	15.38	9.82	14.72	8.68	26.83	7.96
a	1.29	0	0	18.88	16.38	20.19	9.05	35.50	0
b	1.76	3.4	10.31	12.17	13.09	12.72	8.39	30.92	8.09

注: a: subsection control mode of pH between 7.0 and 8.0; b: periodic control mode of pH between 7.0 and 8.0.

2.4 温度对发酵过程的影响

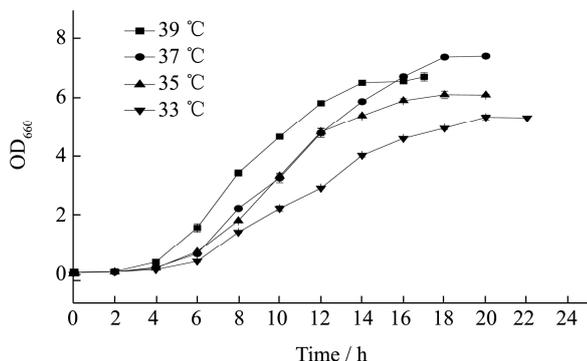


图 15 温度对菌体量的影响

Fig.15 Effect of temperature on biomass

在上述结论的基础上,在 250 mL 摇瓶中进行了温度对发酵过程的考察。图 9 为在分段调节 pH 到 8.00 时不同温度条件下菌体的生长曲线。可以看出温度对菌体量有着显著的影响,37 °C 下菌体浓度最高,发酵液中最终菌株 OD 值最高达到 7.40。另外发酵温度分

生的平均分子量,为了后续分离纯化以及工业化应用,需要进一步了解 HA 分子量的分布情况。因此在了解平均分子量后选取了 HA 产量和分子量相对较高的条件,对 HA 分子量分布情况进行检测。

表 1 为 pH 为 7.00 以及分段和周期性调节 pH 到 8.00 模式下第 14.00 h 发酵液中 HA 在不同分子量区间内的百分比以及 HA 的多分散度。从表中可以看到 pH 为 7.00 条件下和周期性调节到 8.00 模式下分子量分布接近,与分段调节 pH 到 8.00 模式下的分子量分布有一定差距,主要体现在 150~200 万范围、200~250 万范围和 300~600 万范围内,分段调节 pH 到 8.00 模式下这三个范围内分子量分布与 pH 为 7.0 时相比都有一定的提高。另外分段调节模式下在 22~50 万之间、50~100 万和 600~1000 万之间的分子量含量都为 0,明显低于 pH 为 7.00 时。由此可以判定为了获取分子量分布更为集中的 HA,可以选取分段调节 pH 为 8.00 模式进行生产。

别为 39 °C、35 °C 和 33 °C 时最终菌株 OD 值依次下降。当温度为 33 °C 时菌株生长最为缓慢。温度过高或者过低都会导致菌体浓度下降。

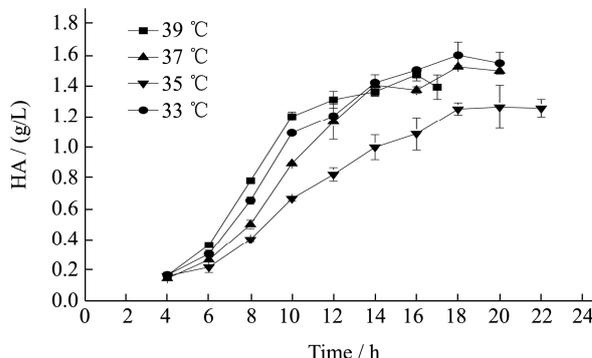


图 16 温度对 HA 产量的影响

Fig.16 Effect of temperature on HA concentration during HA fermentation

4 种温度条件下,发酵液中时 HA 浓度以及所合成的 HA 分子量随时间的变化趋势如图 10 和 11 所示。当温度为 35 °C、37 °C 和 39 °C 时 HA 产量都在 1.50 g

左右,都比较接近,而在 33 °C 时为 1.20 g,与在 37 °C 相比有一定程度的下降。

对于 HA 分子量 33 °C 时却是最高,发酵结束时达到 3.80×10^6 u,而 35 °C 时分子量也可以达到 3.40×10^6 u,比 37 °C,39 °C 时的 3.20×10^6 u 相比有一定提高。

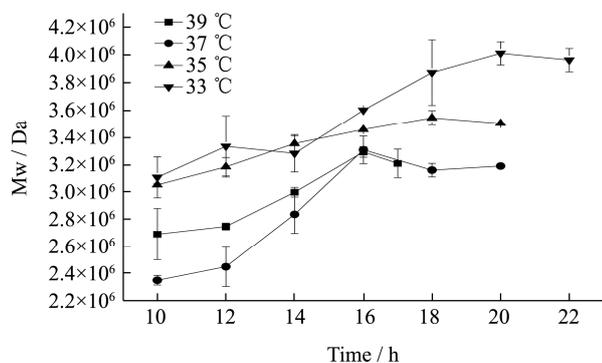


图 17 温度对 HA 分子量的影响

Fig.17 Effect of temperature on HA molecular weight during HA fermentation

3 结论

本文在研究分段和周期性调节 pH 以及不同温度条件发酵过程中对 HA 产量和分子量的影响时发现 pH 在 7.00 和 8.00 之间的分段调控模式下比 pH 为 7.00 时获得的 HA 分子量提高了 10.6%,且分子量分布也发生了变化,提高了在 150~200 万范围、200~250 万范围和 300~600 万范围内的 HA 含量,显著降低了多分散系数,而在 33 °C 条件下收获时 HA 分子量比 37 °C 培养时提高了 18.70%,为后续工业化生产分子量更为集中的 HA,同时降低不同分子量 HA 分离成本提供了参考。

参考文献

[1] 杨桂兰,郭学平,栾贻宏.不同相对分子质量透明质酸钠的应用[J].食品与药品,2005,7(12A):1-3
YANG Gui-lan, GUO Xue-ping, LUAN Yi-hong. Application of sodium hyaluronate with different relative molecular mass [J]. Food and Drug, 2005, 7(12A): 1-3

[2] Kim J H, Yoo S J, Oh D K, et al. Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1996, 19(6): 440-445

[3] Johns M R, Goh L T, Oeggerli A. Effect of pH, agitation and aeration on hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* [J]. Biotechnology Letters, 1994, 16(5):

507-512

[4] Hiruta O, Yamamura K, Takebe H, et al. Application of max blend fermentor® for microbial processes [J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1997, 83(1): 79-86

[5] Liu L, Wang Mu G, Chen J. Enhanced hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus* by an intermittent alkaline-stress strategy [J]. Letters in Applied Microbiology, 2008, 46(3): 383-388

[6] 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(7): 2759-2764

[7] 高海军. *Streptococcus zooepidemicus* 生物合成透明质酸的过程优化与代谢网络分析[D].无锡:无锡轻工业学院,1999
GAO Hai-jun. Process Optimization and metabolic network analysis of *Streptococcus zooepidemicus* biosynthesis hyaluronic acid [D]. Wuxi: Wuxi Institute of Light Industry, 1999

[8] Kim S J, Park S Y, Kim C W. A novel approach to the production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2006, 16(12): 1849-1855

[9] 吴华昌,徐静,邓静,等.温度对透明质酸分批发酵的影响及动力学模型[J].四川理工学院学报(自然科学版),2010,23(4): 442-446
WU Hua-chang, XU Jing, DENG Jing, et al. Effects of temperature on batch fermentation of hyaluronic acid and kinetic model [J]. Journal of Sichuan University of Science & Engineering(Natural Science Edition), 2010, 23(4): 442-446

[10] Bitter T, Muir H M. A modified uronic acid carbazole reaction [J]. Analytical Biochemistry. 1962, 4(4): 330-334

[11] Laurent T C, Ryan M, Pietruszkiewicz A. Fractionation of hyaluronic acid the polydispersity of hyaluronic acid from the bovine vitreous body [J]. Biochimica Biophysica Acta, 1960, 42: 476-485

[12] 刘爱华,郭学平,刘丽.透明质酸的一点法测定[J].中国医药工业杂志,2004,35(3):16
LIU Ai-hua, GUO Xue-ping, LIU Li. Determination of intrinsic viscosity of sodium hyaluronate by one point method [J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2004, 35(3): 16

[13] Yu H, Stephanopoulos G. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of hyaluronic acid [J]. Metabolic Engineering, 2008, 10(1): 24-32