

产多聚唾液酸的菌种筛选及产酸条件*

郭良栋 钱世钧** 叶 军 张树政

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 通过对 40 株大肠杆菌进行产多聚唾液酸的筛选, 得到一株高产多聚唾液酸菌株 C-8, 对该菌的一系列培养条件进行了研究。最佳培养基为: 山梨醇 2.5%, 硫酸铵 0.5%, 磷酸氢二钾 90 mmol / L, 胰蛋白胨 1.5%, 硫酸镁 0.04%, pH7.8。在 37℃, 250 r / min 摇床培养 65 h, 可使菌体在每毫升培养液中产多聚唾液酸 1 200 μ g。

关键词 大肠杆菌, 多聚唾液酸, 培养条件

分类号 Q539

唾液酸是一族神经氨酸衍生物, 广泛分布于动物组织和牛奶中, 可以寡聚糖、糖蛋白和糖脂^[1]形式存在。在细胞的表面, 唾液酸与细胞的粘连和识别等现象是密切相关的。同时, 唾液酸及其衍生物在医药上也有重要的功能, 它是一种止咳祛痰剂, 对于中心和外周神经性疾病以及脱髓鞘病均有疗效。如唾液酸胆固醇可以治疗 Alzheimer 型痴呆症, 唾液酸 Lewis^x在抗发炎、抗肿瘤方面有很大用途^[2]。由于唾液酸在动物组织中的含量比较低, 分离和提纯过程比较复杂, 收率较低, 因此, 难以实施大工业化生产, 这必然影响到唾液酸及唾液酸衍生物的开发和利用。1957 年, Barry 和 Goebel 首先在 *E. coli* K235 中发现唾液酸的同聚体——多聚唾液酸^[3], 后来人们相继在其它菌株中发现多聚唾液酸^[4~7]。这为实现多聚唾液酸的微生物工业化生产提供了重要的前提。本文报道产多聚唾液酸菌种的筛选, 探索该菌产多聚唾液酸的生理生化条件, 选出多聚唾液酸高产菌株及其最佳发酵条件。

1 材料和方法

1.1 菌株

大肠杆菌。

1.2 培养基(%)和菌体培养

碳源 1g, 硫酸铵 0.5g, 磷酸氢二钾 1.4g, 硫酸镁 0.04g, pH7.8。将菌种接到含 2ml 培养基的试管中, 37℃, 250r / min 摇床培养 12h, 然后将活化的 2ml 菌液转到含有 50ml 培养基的 250ml 三角瓶中, 37℃, 250r / min, 60h, 离心收集发酵液, 对水透析过夜, 测多聚唾液酸的含量。

1.3 多聚唾液酸的测定方法^[5]

R-试剂: 将间苯二酚 0.2g 溶解在 10ml 水中, 并加入 80ml 浓 HCl 和 0.25ml 0.1mol / L 的硫酸铜, 用水定容到 100ml。

* “九·五”国家科技攻关计划资助项目。

** 负责与联系作者

收稿日期: 1996-12-25

取 0.1ml 样品, 加 1.9ml 蒸馏水, 加 2ml R-试剂, 在沸水中煮 15min, 冷却后加入 4ml 丁酸丁酯: 正丁醇 (85:15), 剧烈振荡, 并在冰水中冷却 10min, 离心 ($1000 \times g$, 5min.), 将有机相转到 1cm 比色杯中, 以未加入样品的为对照, 在 580nm 处测光密度。

2 结果和讨论

2.1 多聚唾液酸高产菌株的筛选

在以葡萄糖 (1%) 为唯一碳源的培养基上, 进行菌株产多聚唾液酸的筛选。除 8 株菌株外, 其余均不产多聚唾液酸, 实验结果见表 1。在菌株 C-8 的培养液中, 多聚唾液酸的含量最高, 即每毫升发酵液中含多聚唾液酸 211.7 μ g。因此, 我们选用此菌株进行以下试验。

表 1 高产多聚唾液酸菌株的筛选

Table 1 The screening of higher-yield strain of colominic acid

菌株 Strain	多聚唾液酸 Colominic acid (μ g/ml)	生物量 Biomass ($A_{600} \times 10$)	菌株 Strain	多聚唾液酸 Colominic acid (μ g/ml)	生物量 Biomass ($A_{600} \times 10$)
C-1	130.5	0.220	C-5	101.5	0.152
C-2	101.5	0.220	C-6	108.8	0.184
C-3	121.8	0.252	C-7	79.8	0.274
C-4	137.8	0.176	C-8	211.7	0.338

2.2 不同碳源对菌体产多聚唾液酸的影响

选用 16 种碳源 (1%) 进行实验。实验结果见表 2, 在以山梨醇为碳源的发酵液中, 多聚唾液酸的产量最高, 每毫升培养液中含多聚唾液酸 493.5 μ g, 同时, 菌体的生物量也是最高的。由此可见, 山梨醇为该菌产多聚唾液酸的最佳碳源。

2.3 不同浓度的山梨醇对菌体产多聚唾液酸的影响

在以山梨醇为唯一碳源的培养基中, 加入不同量的山梨醇进行实验。随培养基中山梨醇含量的增加, (0.5%~2.5%) 培养液中多聚唾液酸的量也随之升高, 当培养基中山梨醇为 2.5% 时, 培养液中的多聚唾液酸含量达到最高值, 即每毫升培养液中含 605 μ g, 但随培养基中山梨醇含量的继续增加, 培养液中的多聚唾液酸含量反而逐步降低, 即过高的碳源可能抑制菌体产生多聚唾液酸。

2.4 不同氮源对菌体产多聚唾液酸的影响

在以山梨醇为碳源的培养基中, 选用 26 种氮源 (每种含氮量均为 0.11%) 进行实验。实验结果见表 3, 在无机氮源中, 以硫酸铵为最佳, 每毫升培养液中含多聚唾液酸 667 μ g; 而在有机氮源中, 以胰蛋白胨为最佳, 每毫升培养液中含多聚唾液酸 855.5 μ g。另外, 从生物量上看, 无论是在无机氮源, 还是在有机氮源中, 菌体的产酸量与其生物量无必然的正相关关系。按照实验的常规, 我们选用硫酸铵作基本氮源, 然后添加胰蛋白胨, 作为该菌产多聚唾液酸的复合氮源。

2.5 不同浓度胰蛋白胨对菌体产多聚唾液酸的影响

在以山梨醇 (1%) 为碳源、硫酸铵为氮源的培养基中, 加入不同量的胰蛋白胨进行实验。随培养基中胰蛋白胨逐渐增加 (0%~1.5%), 菌体的产酸量也随之升高, 当培养基中含

表 2 不同碳源对菌体产多聚唾液酸的影响

Table 2 Effect of various carbohydrates on the production of colominic acid

碳 源	多聚唾液酸	生物量	碳 源	多聚唾液酸	生物量
Carbohydrate	Colominic acid	Biomass	Carbohydrate	Colominic acid	Biomass
	($\mu\text{g/ml}$)	($A_{600}\times 10$)		($\mu\text{g/ml}$)	($A_{600}\times 10$)
葡萄糖 Glucose	246.5	0.286	甘露醇 Mannitol	340.8	0.282
果糖 Fructose	386.4	0.398	甘露糖 Mannose	240.5	0.308
半乳糖 Galactose	333.5	0.284	糖浆 Molasses	213.9	0.375
木糖 Xylose	332.5	0.200	淀粉 Starch	134.1	0.140
乳糖 Lactose	362.5	0.265	丙酮酸 Pyruvic acid	195.8	0.350
麦芽糖 Maltose	369.8	0.236	甘油 Glycerol	221.2	0.345
蔗糖 Sucrose	364.8	0.165	丁二酸 Succinic acid	126.9	0.036
山梨醇 Sorbitol	493.5	0.408	苹果酸 Malic acid	201.6	0.038

表 3 不同氮源对菌体产多聚唾液酸的影响

Table 3 Effect of various nitrogen resources on the production of colominic acid

氮 源	多聚唾液酸	生物量	氮 源	多聚唾液酸	生物量
Nitrogen resource	Colominic acid	Biomass	Nitrogen resource	Colominic acid	Biomass
	($\mu\text{g/ml}$)	($A_{600}\times 10$)		($\mu\text{g/ml}$)	($A_{600}\times 10$)
硫酸铵 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	667.0	0.345	谷氨酰胺 Glutamine	551.0	0.522
硝酸铵 NH_4NO_3	601.8	0.370	脯氨酸 Proline	195.8	0.520
氯化铵 NH_4Cl	580.0	0.380	天冬氨酸 Aspartic acid	ND	0.102
醋酸铵 NH_4Ac	443.7	0.290	甘氨酸 Glycine	462.6	0.300
磷酸氢二铵 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	558.3	0.450	天冬酰胺 Asparagine	616.3	0.500
碳酸铵 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	369.8	0.406	丝氨酸 Serine	696.0	0.680
硝酸钠 NaNO_3	10.0	0.100	半胱氨酸 Cysteine	420.5	0.262
酪蛋白氨基酸 Casamino acid	652.5	0.560	丙氨酸 Alanine	297.3	0.436
酪蛋白水解物 Casein hydrolysate	695.0	0.900	组氨酸 Histidine	380.6	0.195
玉米浆 Corn steep liquor	551.0	0.542	缬氨酸 Valine	411.8	0.308
胰蛋白胨 Tryptone	855.5	0.700	蛋氨酸 Methionine	471.3	0.068
酵母提取物 Yeast extraction	609.0	0.900	亮氨酸 Leucine	271.9	0.160
谷氨酸 Glutamic acid	674.3	0.275	尿素 Urea	369.8	0.275

ND: 未检测到 No detected.

胰蛋白胨为 1.5% 时, 菌体产多聚唾液酸的量最高, 每毫升培养液中含 966 μg 多聚唾液酸, 但当培养基中胰蛋白胨含量超过 1.5% 时, 菌体产酸量随胰蛋白胨含量的增加反而降低。同时看出, 在含 1.0%~2.5% 的胰蛋白胨培养基中, 均可使该菌的产酸量处于较高水平。

2.6 不同浓度磷酸氢二钾对菌体产多聚唾液酸的影响

在分别以山梨醇(1%), 硫酸铵为唯一碳源、氮源的培养基中, 加入不同浓度的磷酸氢二钾(0, 20, 40, 60, 80, 90, 100, 120, 150, 200mmol / L) 进行实验。实验结果表明, 在含 90mmol / L 的磷酸氢二钾培养基中, 菌体产多聚唾液酸的量最高, 可使每毫升培养液中含多聚唾液酸 677 μg 。

2.7 不同培养温度对菌体产多聚唾液酸的影响

实验结果见图 1, 菌体在不同的温度下培养, 菌体的产酸量不同, 在 37℃ 培养时, 菌体产多聚唾液酸的量最高, 在低于 20℃ 时, 菌体几乎不产多聚唾液酸, 这与 Troy P A 等人的实验结果一致^[8,9]。而高于 40℃ 时菌体的产酸量急剧下降, 其原因可能是由于菌体的生长明显受到抑制, 从而影响菌体的产酸量。

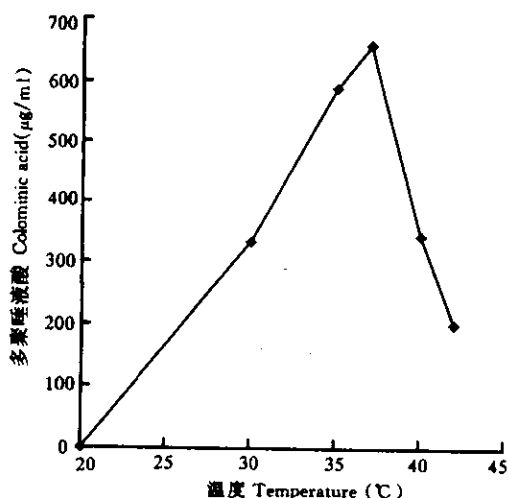


图 1 不同的培养温度对菌体产酸的影响

Fig.1 Effect of different culture temperature on the production of colominic acid

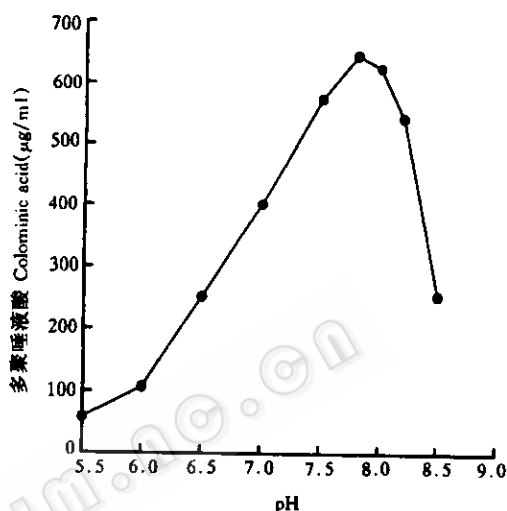


图 2 培养基的起始 pH 对菌体产酸的影响

Fig.2 Effect of initial pH of the medium on the production of colominic acid

2.8 培养基中的起始 pH 对菌体产多聚唾液酸的影响

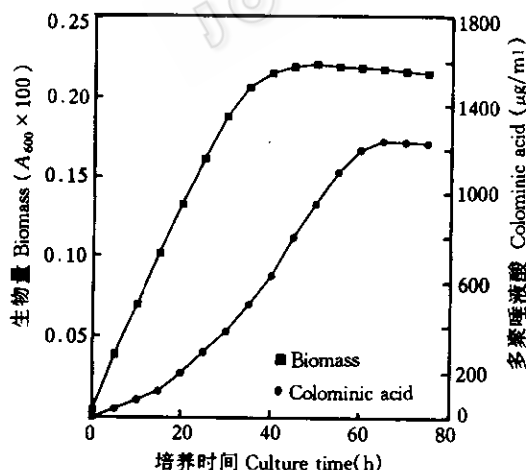


图 3 菌体的生长曲线与产酸的关系

Fig.3 The relationship of growth curve and the production of colominic acid

菌体在不同起始 pH 的培养基中进行培养。实验结果见图 2, 在 pH 7.8 的培养基中, 菌体产多聚唾液酸的量最高, 每毫升培养液中含多聚唾液酸 645 μg, 在 pH 7.5~8.2 之间, 菌体产酸量维持在较高水平, 培养基的 pH 值低于 6.0 时, 菌体产多聚唾液酸的量明显受到抑制。

2.9 在最佳培养条件下菌体的生长曲线与其产多聚唾液酸的关系

通过以上实验得出该菌产多聚唾液酸的最佳培养基为: 山梨醇 2.5%, 胰蛋白胨 1.5%, 磷酸氢二钾 90 mmol/L, 硫酸铵 0.5%, 硫酸镁 0.04%, pH 7.8; 在

37℃, 250 r/min 下培养菌体。实验结果见图 3。从菌体的生长曲线看, 由于培养基中的营养比较丰富, 菌体生长的对数期维持比较长, 培养 40h 后, 菌体生长才进入稳定期, 因此,

菌体生物量也比较大(A_{600} : 0.22×100)。从多聚唾液酸的产生曲线看,菌体生长的前40h,多聚唾液酸的产量比较低,特别是在培养前20h,菌体的产酸量相当低,只有培养40h以后,菌体的产酸量开始加速,培养65h后,菌体的产酸量达到最高水平,即每毫升培养液可达到1200 μ g。这也说明多聚唾液酸是次级代谢产物,只有在菌体生长达到平衡期时才大量产生^[10]。

参 考 文 献

- [1] Feeney R E, Rhodes M B, Anderson J S. *J Biol Chem*, 1960, **235**(9): 2633~2637.
- [2] Varki A. *Glycobiology*, 1992, **2**(1): 25~40.
- [3] Barry G T, Goebel W F. *Nature*, 1957, **179**: 206.
- [4] Barry G T. *Nature*, 1959, **183**: 117~118.
- [5] Svennerholm L. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1957, **24**(3): 604.
- [6] Troy F A, Feraman F E, Heath E C. *J Biol Chem*, 1971, **246**(1): 118~133.
- [7] Blacklow R S, Warren L. *J Biol Chem*, 1962, **237**(11): 3520~3526.
- [8] Whitfield C, Troy F A. *J Biol Chem*, 1984, **259**(20): 12776~12780.
- [9] Troy F A, McCloskey M A. *J Biol Chem*, 1979, **254**(15): 7377~7387.
- [10] Rodriguez-Aparicio L B, Reglero A, Ortizetal A I. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1988, **27**: 474~483.

STUDIES ON THE SELECTION OF STRAINS PRODUCING COLOMINIC ACID AND CULTURE CONDITIONS

Guo Liangdong Qian Shijun Ye Jun Zhang Shuzheng

(Institute of Microbiology Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract One strain *E. coli* C-8, the highest yield of colominic acid, was selected from 40 *E. coli* strains in the medium in which glucose and ammonium sulfate were the only carbon and nitrogen resources. An optimum medium for the growth and colominic acid production of *E. coli* C-8 was studied. The optimum carbon resources for colominic acid production was sorbitol selected from 16 kinds of carbons, and its optimum concentration was 2.5%. The optimum inorganic and organic nitrogen resources for colominic acid production were ammonium sulfate (0.5%) and tryptone (1.5%), respectively. The optimum concentration of K_2HPO_4 was 90mmol / L. The optimum culture temperature was 37 $^{\circ}$ C, but no colominic acid was produced below 20 $^{\circ}$ C. The optimum pH range was 7.5~8.2. The strain growth in the optimum medium kept logarithmic phase in 40h (maxim $A = 22$). The colominic acid secreted into medium was much lower before 20h, but high biosynthetic rate of colominic acid was detected after 40h, the colominic acid reached the highest level (1200 μ g / ml) at 65h.

Key words *Escherichia coli*, Colominic acid, Culture conditions