

青霉素钠与氯化钠对 N-乙酰神经氨酸发酵的影响

高兰兰^{1,2}, 吴金勇¹, 袁丽霞¹, 陈祥松¹, 朱微微¹, 孙立洁¹, 姚建铭¹

(1.中国科学院合肥物质科学研究院等离子体物理研究所,合肥 230031;2.中国科学技术大学,合肥 230026)

摘要:重组枯草芽孢杆菌生产 N-乙酰神经氨酸的过程中,通过加入表面活性剂和抗生素等方法来改善细胞通透性,以减少产物和副产物所带来的反馈抑制,从而促进细胞生长和产物的合成.对比研究了吐温 20、吐温 60、吐温 80 及青霉素钠对重组枯草芽孢杆菌摇瓶和 5 L 发酵罐发酵的影响,确定青霉素钠具有明显增强该菌种发酵产 N-乙酰神经氨酸的效果.通过对青霉素钠的添加时间和添加量进行了优化,确定在 10 h 和 34 h 均添加 200 mg · L⁻¹ 青霉素钠最优,使 N-乙酰神经氨酸的产量达到 7.17 g · L⁻¹,相比对照提高了 38.42%.在利用青霉素钠提高目标产物的基础上,又通过在发酵培养基成分中添加 0.75% 氯化钠来改变细胞渗透压,从而增强细胞通透性.实验证明,N-乙酰神经氨酸的产量进一步增加,最终达到 7.96 g · L⁻¹.

关键词:枯草芽孢杆菌;N-乙酰神经氨酸;青霉素钠;氯化钠

中图分类号:Q939.9

文献标志码:A

唾液酸(sialic acid,简称 SA),属于神经氨酸的衍生物,是一类含有 9 个碳原子且具有吡喃糖结构的酸性氨基糖的总称,其中最主要的组分是 N-乙酰神经氨酸^[1-2].据研究,唾液酸在人体许多生理过程中起着重要作用,具有促进婴幼儿智力发育、抗老年痴呆、提高肠道对维生素和矿物质吸收、抗病毒、美容护肤、提高人体免疫力、抑制白细胞黏附和消炎等一系列功能^[3-6].2017 年 5 月,国家卫计委公布的 10 种新食品原料中就包含 N-乙酰神经氨酸,批准其可应用于食品领域.另外,也可应用于保健品、化妆品、药物研发等领域,具有很大的经济价值与应用前景.

天然原料中唾液酸含量低,造成提取和分离纯化困难,生产成本低;化学方法存在反应条件苛刻、收率低和污染大等缺点;利用酶催化和全细胞生物催化法生产 N-乙酰神经氨酸的研究也较多,但也存在成本高的问题^[7-8].近年来,应用微生物发酵法生产唾液酸与聚唾液酸的研究成为热点,大多使用的是大肠杆菌,而关于枯草芽孢杆菌的研究较少.枯草芽孢杆菌是 GRAS 认证的安全菌株,由于其不具有致病性、不易受噬菌体污染等优势^[9-10],作为一种重要的宿主菌被广泛应用于食品工业生产.因此,利用枯草芽孢杆菌生产食品、医药原料与材料,如 N-乙酰神经氨酸,具有很高的安全性和巨大的应用价值.

然而,目前利用枯草芽孢杆菌生产 N-乙酰神经氨酸的产量较低,主要是由于胞内有大量的 N-乙酰神经氨酸滞留,对菌体生长和代谢产生反馈抑制.因此,若能改善细胞通透性,促使代谢产物分泌至胞外,预期可提高目标产物产量.据文献报道,可以通过添加表面活性剂、有机溶剂、抗生素等^[11-12]方法来改善细胞通透性,从而达到增加代谢产物的目的.如王峰等^[13]研究发现吐温 60 增加了芽孢杆菌细胞膜脂质中不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比例且提高了液体发酵时环糊糖精转移酶的产量.张和春等^[14]分别研究了青霉素、DM-SO、吐温 80 对天蓝色链霉菌蓝色素生物合成的影响.另外,Magdalena Rakicka 等在解脂耶罗维亚酵母发酵液中添加表面活性剂司盘 20 增加了赤藓糖醇和甘露醇的产量,并证明添加氯化钠增加了细胞的渗透压^[15].本文在上述研究的基础上,尝试通过在枯草芽孢杆菌发酵过程中添加表面活性剂吐温 20、吐温 60、吐温 80、

收稿日期:2017-12-27;**修回日期:**2018-03-20.

基金项目:国家自然科学基金青年项目(21506235);安徽省自然科学基金面上项目(1508085MB38).

作者简介:高兰兰(1991-),女,河南洛阳人,中国科学技术大学在读硕士研究生,研究方向为微生物育种及发酵工艺研究,E-mail:961782320@qq.com.

通信作者:孙立洁,副研究员,博士,E-mail:ljsun@ipp.ac.cn;姚建铭,研究员,博士生导师,E-mail:jmyao@ipp.ac.cn.

青霉素钠及氯化钠,研究了不同添加剂对重组枯草芽孢杆菌发酵生产 N-乙酰神经氨酸产量的影响.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

重组枯草芽孢杆菌 BS-G2,由本实验室构建.

1.1.2 主要试剂和器材

吐温 20、吐温 60、吐温 80:国药化学纯;青霉素钠(400 万单位):山东圣旺药业有限公司;氯化钠:国药分析纯;N-乙酰神经氨酸标准品:Sigma Aldrich.

1.1.3 仪器与设备

5 L 发酵罐:上海保兴生物设备工程有限公司;高效液相色谱仪:岛津公司;B203LED 生物显微镜:重庆奥特光学仪器有限公司.

1.1.4 培养基

固体培养基:胰蛋白胨 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;酵母粉 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;氯化钠 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;琼脂 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

种子培养基:胰蛋白胨 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;酵母粉 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;氯化钠 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

发酵培养基:甘油 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;酵母粉 $16 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;磷酸二氢钾 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;硫酸铵 $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;七水硫酸镁 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;IPTG $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$.

1.2 实验方法

1.2.1 摇瓶发酵培养

用接种环蘸取少量甘油管菌液,并画线接种至固体平板上,37 °C 过夜培养.接着从平板上挑取一环活化菌种,接种至 50 mL/250 mL 的 LB 液体种子培养基中,于 37 °C、200 r · min⁻¹ 条件下,培养 5 h,得到种子液.按照 5% 接种量将种子液接入 100 mL/500 mL 发酵培养基的摇瓶中,37 °C、200 r · min⁻¹,培养 72 h.

1.2.2 5 L 罐发酵培养

将保藏菌种画线接种至固体平板上活化,37 °C 培养过夜.然后从平板上挑取一环菌种,将其接种至 10 mL/50 mL 的 LB 液体种子培养基中,37 °C、200 r · min⁻¹ 条件下培养 5 h,即为一级种子液;按 1% 接种量将一级种子液转接至 80 mL/1 L 液体摇瓶中,同上培养;将培养好的种子液接入 5 L 发酵罐中开始培养[通过 25%(质量小数)的氨水来维持 pH 为 6.80,发酵温度 37 °C,溶氧保持在 30% 以上].该发酵采用补料分批发酵的方法,以甘油为主要碳源,甘油耗完后按照 $4.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 速率补加碳源.

1.2.3 N-乙酰神经氨酸的检测

胞外产物检测:将发酵液直接 12 000 r · min⁻¹ 离心 5 min,所得上清液即用于检测胞外产物的含量.

总产物检测:将发酵液 100 °C 水浴 5 min 破坏菌体细胞壁,然后将其于 12 000 r · min⁻¹ 离心 5 min,取上清液用于总产物检测.

利用 HPLC 检测样品中 N-乙酰神经氨酸的含量,高效液相色谱型号:岛津 Lc-15c.

检测条件:检测柱 Bio-Rad AMINEX HPX 87H Organic Analysis Column (300 mm × 7.8 mm);柱温 60 °C;流动相是 6 mmol 硫酸,流速是 0.6 mL/min;检测波长 210 nm.

2 结果与分析

2.1 补料分批发酵的特点

枯草芽孢杆菌工程菌补料分批发酵过程中,菌体湿重、N-乙酰神经氨酸产量的时间变化曲线如图 1 所示.培养 48 h 后,菌体的湿重几乎变化不大,趋于稳定.而 N-乙酰神经氨酸前期增加较慢,36~48 h 间增长速率较大,紧接着增加速率降低.但 84 h 时检测到 N-乙酰神经氨酸突然增长很大,96 h 之后趋于稳定.此外,从发酵 48 h 开始,显微镜观察发现有大量细胞碎片,并且随着发酵的进行,细胞碎片越来越多,说明细胞在 48 h 时开始逐渐衰亡.结合 N-乙酰神经氨酸的产量发酵后期变化之大,以及细胞衰亡的现象,推测细胞内可能

有大量 N-乙酰神经氨酸未被分泌到胞外,抑制菌体生长与代谢,导致细胞过早衰亡与裂解.而部分菌体裂解后,胞内部分 N-乙酰神经氨酸释放,直接导致 N-乙酰神经氨酸产量增加显著.因此,需要检测胞内外 N-乙酰神经氨酸浓度的变化来验证是否存在目标产物细胞通透性障碍.

2.2 发酵过程中胞内外产物浓度变化

为了解枯草芽孢杆菌发酵产 N-乙酰神经氨酸过程中,是否存在胞内产物细胞通透性障碍问题:解决影响发酵产量的瓶颈问题,分别检测发酵液细胞破碎前和细胞破碎后其中 N-乙酰神经氨酸产量,其结果如图 2 所示.从图中可以看出细胞破碎前、后 N-乙酰神经氨酸产量并不一致,发酵过程中破碎后产物前期增加速率较大,后期从 48 h 开始 N-乙酰神经氨酸增加速率减慢,72 h 起便趋于稳定.由此看来,细胞破碎前的胞外产物并不能真实地反应菌种生产能力,后期实验均以细胞破碎后所测 N-乙酰神经氨酸产量作为参考依据.并且菌种本身确实存在胞内产物分泌障碍和代谢抑制的问题,若能在一定程度上改善细胞通透性,促进产物分泌和缓解产物抑制,对其工业化应用具有很大的意义与价值.

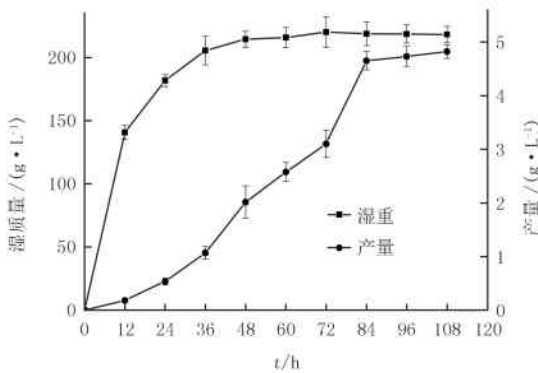


图1 枯草芽孢杆菌补料分批发酵的生长曲线

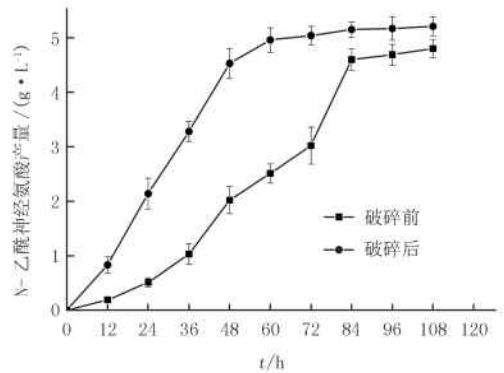


图2 枯草芽孢杆菌发酵过程中胞内外目标产物变化

2.3 透性化试剂对摇瓶发酵的影响

为探索部分表面活性剂与抗生素是否能够改善细胞通透性,从而促进枯草芽孢杆菌发酵产 N-乙酰神经氨酸,我们先在摇瓶上进行了初步试验.在发酵培养 10 h 时,向发酵液中分别添加了不同浓度的吐温 20、吐温 60、吐温 80 与青霉素钠来进行实验,其结果如图 3 所示.与对照组相比,添加各种表面活性剂对 N-乙酰神经氨酸产量影响不大,推测一方面可能是因为表面活性剂会影响细胞生长和代谢相关的一些酶的活性,以及影响代谢流的分配,并不能促进代谢产物的合成;另一方面,由于表面活性剂与细胞膜相互作用是一个复杂的过程,与细胞生理条件、表面活性剂对膜亲和性等因素有关^[16],因此,在该实验条件下改善细胞通透性的效果并不显著,未能达到预期的实验目的与结果.而青霉素钠相比对照组和其他表面活性剂,效果相对较好,当添加 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素钠时,总 N-乙酰神经氨酸产量提高了约 9.59%,这可能与青霉素可抑制细菌细胞壁合成有关^[17].青霉素会抑制肽聚糖合成中转肽酶的活性,引起其结构中肽桥之间无法交联,造成细胞壁的缺损,从而有利于代谢产物泄漏到胞外,进而缓解代谢抑制.

2.4 透性化试剂在 5 L 罐中试放大的结果

由于摇瓶发酵中 pH、溶解氧等条件的限制,使其发酵条件和结果与工业上扩大化生产有很大的不同.在以上不同浓度透性化试剂摇瓶发酵的探索与优化基础上,为了充分验证其工业化应用的可行性,又对以上试验的最佳表面活性剂和青霉素钠浓度进行 5 L 罐放大生产验证,其结果如表 1 所示.通过比较可知,在所有添加组中,青霉素钠组对 N-乙酰神经氨酸产量的促进作用最明显,使 N-乙酰神经氨酸产量增加了 20.08%,并延迟了细胞的衰亡时间到 84 h.对照组实验条件下,由于菌株自身存在目标产物分泌障碍和胞内积累的问题,细胞于 72 h 就开始大部分衰亡,发酵周期较短,结果 N-乙酰神经氨酸产量偏低.通过添加青霉素钠的方法,推测其可改善细胞通透性,给细胞代谢提供较好的胞内环境,促进产物分泌与合成,延长细胞生命周期,提高细胞发酵的效率和产量.

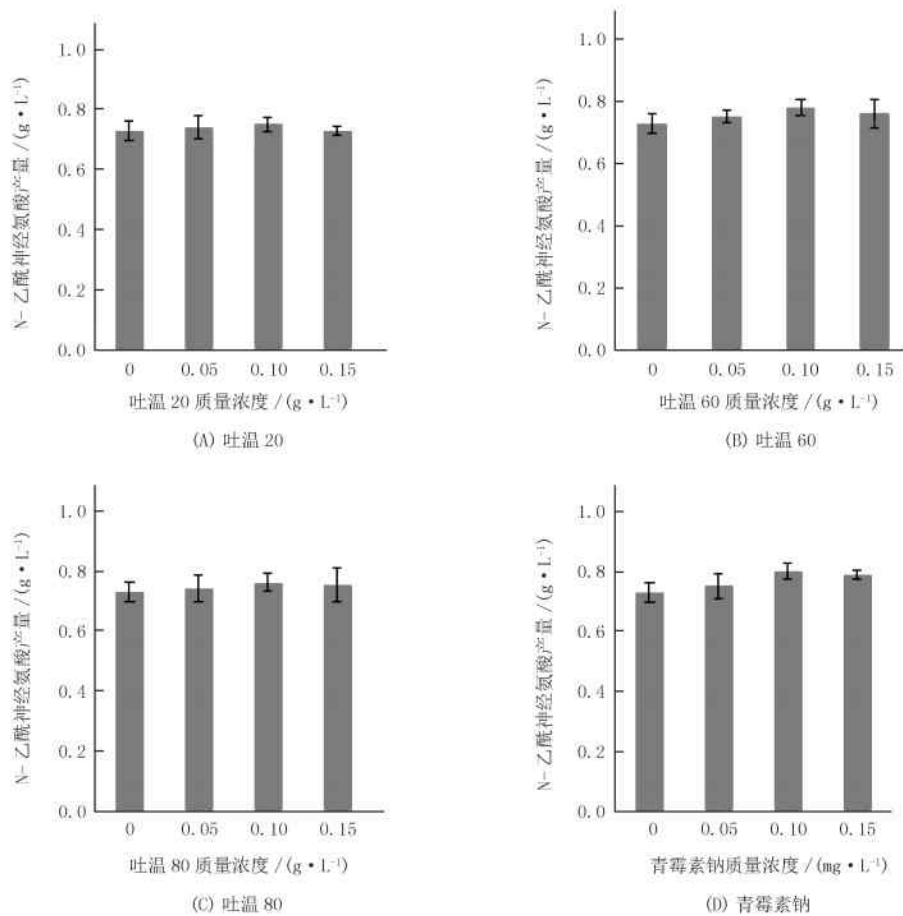


图 3 不同条件表面活性剂和青霉素钠对摇瓶发酵的影响

表 1 透性化试剂 5 L 罐放验证结果

条件	发酵时间/h	Neu5Ac 产量/(g · L ⁻¹)	增长率/%
对照	72	5.18	—
0.10%吐温 20	72	5.35	3.28
0.15%吐温 60	72	5.42	4.63
0.05%吐温 80	72	5.37	3.67
100 mg/L 青霉素钠	84	6.22	20.08

2.5 青霉素钠添加时间与添加量的优化

通过以上对表面活性剂和青霉素钠在 5 L 罐放大试验的验证,发现添加青霉素钠对 N-乙酰神经氨酸的产量有促进作用,因此,进一步对青霉素钠的添加时间和添加量做了优化。

首先,对青霉素钠的添加时间进行了研究,在发酵培养 0 h、10 h、34 h、46 h 分别添加 100 mg · L⁻¹青霉素钠,其结果如图 4 所示。从中可以看出,在发酵培养初始添加青霉素钠后,N-乙酰神经氨酸产量相比对照组明显降低,猜测可能是发酵初期菌种处于延迟期,未适应新环境,菌体生长代谢较慢,生物量较少,由于青霉素具有一定的抑菌作用,过早添加青霉素钠后,可严重抑制菌体的代谢增殖。在发酵 10 h 的添加效果最好,此时正是细胞生长的指数增长期,在保证一定细胞的基础上,添加青霉素钠后可抑制新生细胞壁的形成,改善了新生细胞的通透性。由于胞内药物被不断增加的新生细胞所稀释,所以此刻细菌仍保持较高的增长速率^[18],获得大量细胞壁残缺的细胞,导致了胞内 N-乙酰神经氨酸不断分泌到胞外,总体产量增加。另外,34 h 添加的效果也较好,而 46 h 添加对发酵影响不大,可能 46 h 时菌体生长繁殖减慢,大部分细菌细胞壁已形成,此时添加青霉素钠仅对少数新形成的细胞有作用,总体效果不大。由此可见,青霉素钠的添加时间直接关

系到其对发酵的作用效果。

青霉素游离酸或盐类的水溶液均不稳定,不耐热,遇酸、碱、重金属等易失效,同时一次添加大量青霉素多少会影响菌体生长与代谢,因此,在确定 10 h 和 34 h 添加效果较好的基础上,设计了在这两个时间点添加的方法。接着又对添加量进行了实验,分别在 10 h 和 34 h 均添加 100、200、300、400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的青霉素钠,其结果如图 5。可知随着青霉素钠添加量的增加,N-乙酰神经氨酸产量先增加后降低,在 10 h 和 34 h 均添加 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素钠时最优,达到 7.18 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,相比对照提高了 38.42%。当青霉素钠添加量为 300 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,N-乙酰神经氨酸产量逐渐降低,根据 Johan Elf^[18]等相关研究阐述,猜测可能是抗生素浓度超过了一定的范围,导致胞内药物浓度和细菌生长速率的双稳态被打破,因此,抑制了菌体的生长和代谢。

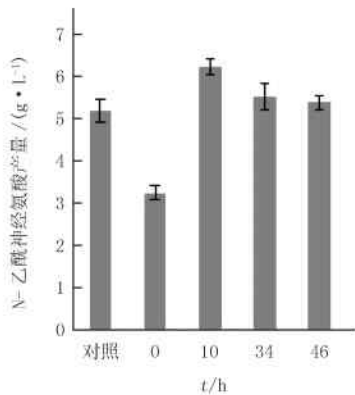


图4 青霉素钠不同时间添加对发酵的影响

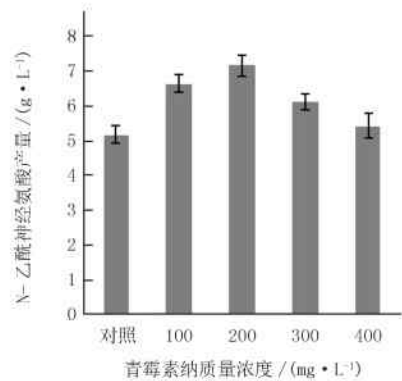


图5 青霉素钠不同剂量添加对发酵的影响

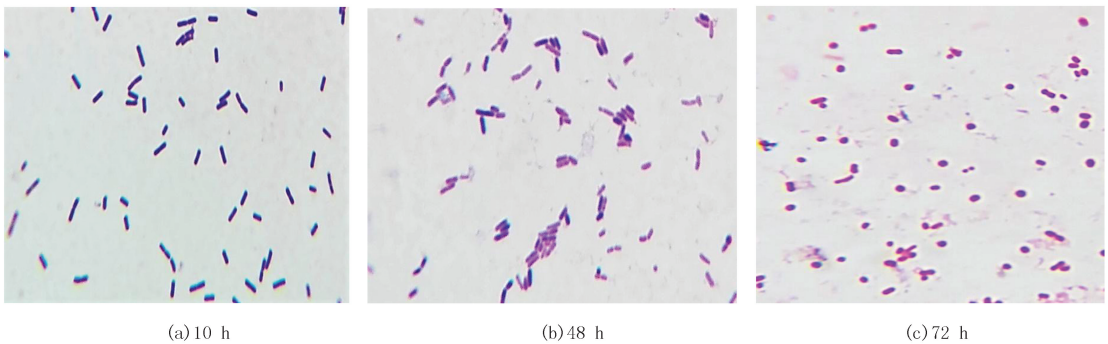


图6 发酵过程中不同时间菌体革兰氏染色镜检(100倍显微镜)

5 L 发酵罐 10 h 和 34 h 均添加 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素钠的条件下,在不同发酵时间点对菌体进行染色与镜检观察,如图 6 所示。其中图 A 为未添加青霉素钠的菌体,革兰氏染色后为紫色;发酵 48 h 后菌体镜检如图 B 所示,可以看到许多菌体呈现粉紫色,推测是因为添加青霉素钠使部分新生成菌体的细胞壁残缺,从而表现出革兰阴性菌染色特征;图 C 为发酵结束时的菌体染色后观察的形态,可见很多菌体已变成圆球状,推测可能是由于菌体细胞壁完全缺失后为了原生质体,或者细胞壁残缺后对渗透压敏感,导致细胞吸水膨胀。因此,从发酵过程中菌体形态特征的变化,也可看出添加青霉素钠对菌体发酵产 N-乙酰神经氨酸确实有较大的影响。

2.6 进一步添加氯化钠对 N-乙酰神经氨酸产量的影响

据相关文献报道,添加氯化钠可改变细胞的渗透压,从而提高细胞通透性。因此在 10 h 和 34 h 均添加 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素钠的基础上,在发酵培养基中分别添加不同浓度的氯化钠进行探索,结果如图 7 所示。通过比较发现,当发酵培养基中添加 0.75% 的氯化钠时,N-乙酰神经氨酸的产量最高,达到了 7.96 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,相比未添加氯化钠组提高了 11.02%。随着氯化钠浓度的增高,则可能会抑制菌体生长,反而导致产量呈下降

趋势.氯化钠可以通过改变细胞渗透压来提高细胞通透性,另外在青霉素钠发挥作用后,新生菌体细胞壁会部分残缺或完全缺失,氯化钠也可以为细胞提供较好的渗透压环境来保证细胞正常生长与代谢.实验证明,氯化钠对增强重组枯草芽孢杆菌发酵产 N-乙酰神经氨酸有一定的效果.

3 讨 论

通过不同浓度表面活性剂吐温 20、吐温 60、吐温 80 和青霉素钠对重组枯草芽孢杆菌产物 N-乙酰神经氨酸影响的研究,可以发现吐温类表面活性剂并不能明显提高 N-乙酰神经氨酸的产量,而青霉素钠却有较好的效果.推测其主要原因是吐温类表面活性剂影响了菌体的生长与代谢途径,而青霉素钠使菌体细胞壁肽聚糖合成受阻,细胞通透性得到了改善,从而提高了 N-乙酰神经氨酸的产量.此外,添加氯化钠可以使细胞维持较好的渗透压,为细胞壁受损细胞提供良好的生长环境,进一步提高了目标产物产量.通过青霉素钠添加时间与添加量的探索,以及氯化钠浓度的优化,最终确定发酵培养基中添加 0.75% 氯化钠,且分别在 10 h 和 34 h 添加 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素钠,N-乙酰神经氨酸产量达到了 $7.96 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,相比对照提高了 53.67%.

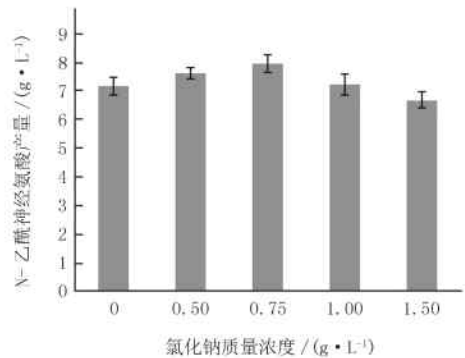


图 7 氯化钠对 N-乙酰神经氨酸产量的影响

参 考 文 献

- [1] Varki A. Sialic acids in human health and disease[J]. Trends in Molecular Medicine, 2008, 14(8): 351-360.
- [2] Maru I, Ohnishi J, Ohta Y, et al. Why is sialic acid attracting interest now Complete enzymatic synthesis of sialic acid with N-acetylglucosamine 2-epimerase[J]. Journal of bioscience and bioengineering, 2002, 93(3): 258-265.
- [3] 李宏越, 柳鹏福, 史吉平, 等. 唾液酸的生理功能, 应用及其生产方法[J]. 食品工业科技, 2014, 35(3): 363-368.
- [4] Schnaar R L, Gerardyschahn R, Hildebrandt H. Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration.[J]. Physiological Reviews, 2014, 94(2): 461-518.
- [5] 郁丹凤. 聚唾液酸和唾液酸提取工艺的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008.
- [6] Wang B. Sialic acid is an essential nutrient for brain development and cognition[J]. Annual review of nutrition, 2009, 29: 177-222.
- [7] 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.
- [8] Chen X, Varki A. Advances in the biology and chemistry of sialic acids[J]. ACS chemical biology, 2010, 5(2): 163-176.
- [9] 刘延峰. 代谢工程改造枯草芽孢杆菌高效合成 N-乙酰氨基葡萄糖[D]. 无锡: 江南大学, 2015.
- [10] Lakshmi S G, Jayanthi N, Saravanan M, et al. Safety assesment of Bacillus clausii UBBC07, a spore forming probiotic[J]. Toxicology Reports, 2017, 4: 62-71.
- [11] 赵伟睿, 胡升, 黄俊, 等. 微生物细胞通透性改善方法与策略[J]. 中国生物工程杂志, 2014, 34(3): 125-131.
- [12] 魏娜, 李柏林, 欧杰. 细胞膜通透性调节在发酵代谢中的重要性[J]. 食品科技, 2006, 31(9): 14-17.
- [13] Wang F, Du G C, Li Y, et al. Enhanced γ -CGTase production by Bacillus Macorous with membrane active substances[J]. Food biotechnology, 2006, 20(2): 171-181.
- [14] 张和春, 范卫民, 张元兴, 等. 调节细胞通透性促进天蓝色链霉菌蓝色素生物合成[J]. 应用与环境生物学报, 2002, 8(5): 540-543.
- [15] Rakicka M, Rywińska A, Cybulski K, et al. Enhanced production of erythritol and mannitol by Yarrowia lipolytica in media containing surfactants[J]. Brazilian journal of microbiology, 2016, 47(2): 417-423.
- [16] Xia W J, Onyuksel H. Mechanistic studies on surfactant-induced membrane permeability enhancement[J]. Pharmaceutical research, 2000, 17(5): 612-618.
- [17] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 544-546.
- [18] Xia W J, Onyuksel H. Mechanistic studies on surfactant-induced membrane permeability enhancement[J]. Pharmaceutical research, 2000, 17(5): 612-618.

Premier League soccer matches[J].Journal of Sports Sciences,2011,29(8):821-830.

Correlation analysis of technical statistical indicators of winning determinant performances at 2015—2016 China Super League

Zhu Jianming

(Department of Physical Education, East China University of Political Science and Law, Shanghai 201620, China)

Abstract: By using the methods of literature review, expert interview, video observation, and mathematical statistics, this paper made a correlation analysis about technical statistical of 240 games at 2015—2016 China Super League(CSL). Based on the view of big data, we hope to provide a data support on both analyzing team abilities and making strategy. Conclusions: 1) High odds have higher numbers in corner, free kicks, goal related and pass and possession indicators than the low one, expect fouls and running distances. 2) Those below indicators have very significant correlations with each other, they are possession with passes ($r=0.798$), shooting numbers with shooting on target ($r=0.735$), goals with win-lose ($r=0.611$), shooting numbers with corner kicks ($r=0.533$), and shooting on target with goals ($r=0.525$). 3) Corner kicks, free kicks, shooting numbers and goals are higher in higher possession group than medium and low ones, however, medium group has more fouls and running distances than higher one.

Keywords: CSL; technical indicators; winning determinant; correlation analysis

[责任编辑 杨浦]

(上接第 79 页)

Effects of penicillin sodium and sodium chloride on the production of N-Acetylneuraminic Acid

Gao Lanlan^{1,2}, Wu Jinyong¹, Yuan Lixia¹, Chen Xiangsong¹, Zhu Weiwei¹, Sun Lijie¹, Yao Jianming¹

(1. Institute of Plasma Physics, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China;

2. University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

Abstract: The present study aimed to enhance the production of N-Acetylneuraminic Acid (Neu5Ac) produced by recombinant *Bacillus subtilis*. Some methods were studied in the fermentation process, such as adding surfactants and antibiotics, which may allow to weaken the feedback inhibition caused by products and by-products. And the effects of different Tween and penicillin sodium on the fermentation of recombinant *Bacillus subtilis* in the shake flasks and 5-L fermenter were investigated. As a result, it was confirmed that penicillin sodium could significantly enhance the fermentation yield of N-Acetylneuraminic Acid. Moreover, the optimal time and dosage of penicillin sodium were determined through a series of experimental optimization. The yield of N-Acetylneuraminic Acid reached to $7.17 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, increased by 38.42% under optimal condition in which $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ sodium penicillin was added into the medium at 10 h and 34 h, respectively. Based on the action of penicillin sodium, the cell osmotic pressure was adjusted by adding 0.75% sodium chloride into the medium components to enhance cell permeability. The results showed that the production of N-Acetylneuraminic Acid increased further, and eventually the yield of $7.96 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ was achieved.

Keywords: *Bacillus subtilis*; N-Acetylneuraminic acid; penicillin sodium; sodium chloride

[责任编辑 王凤产]