

# 兽疫链球菌原生质体激光诱变及高产菌株筛选\*

滕利荣 刘岩厚 张佳 梁冰 王锋

(吉林大学生命科学学院 长春 130023)

**摘要:** 探索了透明质酸(Hyaluronic acid)产生菌—兽疫链球菌(*Streptococcus zooepidemicus*)原生质体制备与再生的最佳条件。研究了酶浓度、酶解时间、高渗液的选择、预处理及高渗预培养等因素的影响。确定了最佳条件为:经1.2%甘氨酸预处理及高渗预培养共同作用2h后,用50U/mL溶菌酶,在NaCl高渗体系中,于39℃作用60min。在此条件下,原生质体形成率可达94.6%,再生率可达18.5%。用不同功率的He-Ne激光照射不同时间诱变原生质体,当功率密度为40mW/cm<sup>2</sup>,照射时间为300s时,其致死率可达99.88%。从存活变异株中筛选出一株高产透明质酸菌株,其产量(2.21g/L)达原始菌株(0.49g/L)的4.5倍。

**关键词:** 透明质酸, 兽疫链球菌, 原生质体, 激光诱变

**中图分类号:** Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 01-0040-06

## LASER MUTAGENESIS AND SELECTION OF *STREPTOCOCCUS ZOOEPIDEMICUS* PROTOPLASTS

TENG Li-Rong LIU Yan-Hou ZHANG Jia LIANG Bing WANG Feng

(College of Life Science, Jilin University, Changchun 130023)

**Abstract:** Conditions about protoplast preparation and regeneration of *Streptococcus zooepidemicus*, which could produce hyaluronic acid, were studied, including the concentration of lysozyme, lytic time, different osmotic stabilizers and the preculture under the high osmotic pressure. As a result, the formation and regeneration rate of protoplasts could reach up to 94.6% and 18.5% respectively under the optimum conditions, before the digestion of lysozyme (50U/mL, 39℃, 60 min) the strain was cultured for 2 hours in 0.6 mol/L NaCl high osmotic pressure liquid medium containing 1.2% Gly. Among different treatments of various laser power and irradiating time, He-Ne laser which acted for 300 seconds with 40mW/cm<sup>2</sup> caused lethality rate as high as 99.88%. Finally, a mutated strain was gained, whose production of HA is 2.21g/L, just 4.5 times as much as the original strain.

**Key words:** Hyaluronic acid, *Streptococcus zooepidemicus*, Protoplast, Laser mutagenesis

透明质酸(Hyaluronic acid, 简称HA)是由 $\beta$ (1-3)葡萄糖苷键和 $\beta$ (1-4)氨基葡萄糖苷键交替连接构成的直链大分子酸性粘多糖。它广泛存在于动物结缔组织和某些微生物荚膜中。由于其结构上的特点,HA具有很高的粘弹性与极强的保水性<sup>[1]</sup>,被广泛应用于临床医学、制药及化妆品工业。早期HA生产是从动物组织如人脐带、鸡冠、牛眼中提取,材料来源有限,纯化复杂。自1937年Kendall<sup>[2]</sup>等发现溶血性链球菌(*Streptococcus haemolyticus*)可以生产HA以来,不少科学工作者致力于微生物发酵法生

\* 国家高等教育科学“十五”规划资助课题(No.2002-20-58-47)

作者还有:孟庆繁,陈佳,洪水声,刘兰英\*\*

\*\* 联系人 Email: ying@public.cc.jl.cn, Tel: 0431-5697204

收稿日期:2003-01-16, 修回日期:2003-06-21

产HA的探索:日本资生堂于1985年首次报道了用链球菌生产HA的方法<sup>[3]</sup>;Kim等人用NTG诱变兽疫链球菌,得到了 $\beta$ -溶血素与透明质酸分解酶缺陷型的高产菌株,产量为6~7g/L<sup>[4]</sup>。国外用链球菌发酵生产HA已达产业化阶段。我国发酵法生产HA的技术尚未成熟,关键是没有高产HA的菌种,目前国内最近报道的发酵生产HA产量为1.88g/L<sup>[5]</sup>。HA生产仍主要从动物组织中提取。

近来激光诱变原生质体已成功应用于多种微生物<sup>[6,7]</sup>,但尚未用于链球菌。本文首次研究了兽疫链球菌原生质体的制备与再生并确定了其最佳条件。采用He-Ne激光诱变链球菌原生质体的方法筛选HA高产菌株,为链球菌菌种诱变提供了新途径,并为发酵法生产HA提供了有应用前景的高产菌株。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

兽疫链球菌(*Streptococcus zooepidemicus*)本实验室提供。

### 1.2 培养基

种子培养基:蛋白胨 12.5g,酵母粉 12.5g,葡萄糖 12.5g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.4g, NaCl 2g,定容至1L, pH 7.0。1.0 M Pa,灭菌 15min。

基本培养基:种子培养基加 20g 琼脂。1.0 M Pa,灭菌 15min。

发酵培养基:葡萄糖 40g,酵母粉 15g,蛋白胨 12.5g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2g,  $\text{MgSO}_4$  1g, NaCl 2g,定容至1L, pH 7.0。1.0 M Pa,灭菌 15min。

再生培养基:上层:种子培养基加苄基嘌呤 20mg,水解酪蛋白 0.1g,蔗糖 170g,琼脂 10g,定容至1L, pH 6.5。下层:配方同上层,琼脂为 20g, pH 6.5。0.75 M Pa,灭菌 20min。

### 1.3 酶液配制

溶菌酶(大连宝泰克生物有限公司, 70,000U/mg)以高渗稳定液溶解至7,000U/mL,  $G_6$  漏斗过滤除菌后4℃保存备用。

### 1.4 高渗溶液

高渗稳定液:

① 0.02 mol/L 顺丁烯二酸, 20 $\mu$ mol/L  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.6mol/L NaCl。② 0.02 mol/L 顺丁烯二酸, 20 $\mu$ mol/L  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.5mol/L 蔗糖。③ 0.02 mol/L 顺丁烯二酸, 20 $\mu$ mol/L  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.8mol/L 甘露醇。

高渗缓冲液:

① 0.1mol/L pH 6.0 的磷酸缓冲液, 0.6mol/L NaCl。② 0.1mol/L pH 6.0 的磷酸缓冲液, 0.5mol/L 蔗糖。③ 0.1mol/L pH 6.0 的磷酸缓冲液, 0.8mol/L 甘露醇。

### 1.5 仪器

HN-1700 型 He-Ne 激光仪,数码相机 Nikon coolpix995,显微镜 Nikon Edipse E200。

### 1.6 方法

1.6.1 菌体培养:将兽疫链球菌接种于种子培养基中,摇床培养(37℃, 150r/min) 14~16h,至对数期。

1.6.2 原生质体制备与再生:向培养 12h 的菌液中加入甘氨酸进行预处理,同时加入

高渗缓冲液进行高渗预培养,继续振荡 2h。取 1mL 菌液,以无菌生理盐水适当稀释后涂布于基本培养基平板上培养 12h 后,计菌落数,为溶菌酶处理前的活菌数 (A)。另取 2mL 菌液,3,500 r/min 离心 5min,沉淀悬浮于 2mL 高渗稳定液中,加入 8mL 溶菌酶溶液混匀后,39℃ 振荡酶解 (160r/min) 一定时间,8,000 r/min 离心 8min,弃上清。用高渗缓冲液洗涤沉淀除酶,得到原生质体。然后将原生质体悬浮于 2mL 高渗缓冲液中。取 1mL 原生质体悬液,用无菌水稀释,使原生质体涨破,以合适稀释度涂布于基本培养基平板上培养 12h,计菌落数,为溶菌酶处理后未脱壁活菌数 (B)。另取 1mL 原生质体悬液适当稀释后以双层平板法于再生培养基上培养 48h,计菌落数,为溶菌酶处理后未脱壁活菌数与原生质体再生菌数之和 (C)。计算原生质体形成率与再生率。

$$\text{原生质体形成率} = \frac{A-B}{A} \times 100\%$$

$$\text{原生质体再生率} = \frac{C-B}{A-B} \times 100\%$$

**1.6.3 菌体形态观察:** 结晶紫染色后光学显微镜下观察,用数码相机拍照。

**1.6.4 激光诱变:** 采用最优条件制备原生质体,取 0.5mL 制得的原生质体悬液置于小试管中,用 5 种功率密度 (1mW/cm<sup>2</sup>、5 mW/cm<sup>2</sup>、10 mW/cm<sup>2</sup>、20 mW/cm<sup>2</sup>、40 mW/cm<sup>2</sup>) 的 He-Ne 激光 (波长 632.8nm) 分别照射 300 s、120 s 和 60 s。

**1.6.5 突变株筛选:** 将激光照射后的原生质体悬液与未经激光照射的原生质体悬液经适当稀释分别涂于再生培养基上再生 48h,前者平板上的菌落数为 D,后者平板上的菌落数为 E。计算致死率。

$$\text{致死率} = \frac{E-D}{E} \times 100\%$$

从诱变后再生平板上挑取单菌落,接种于盛有 25mL 发酵培养基的 250mL 锥形瓶中,37℃,150r/min 发酵培养 20 h,测 HA 含量。

**1.6.6 HA 提取与含量测定:** 取 0.5 mL 发酵液,8,000 r/min 离心 10 min,取上清加 1.0 mL 蒸馏水,3.5 mL 95% 乙醇,混匀后 8,000 r/min 离心 10 min,弃上清,沉淀用 5 mL 蒸馏水溶解。取 1 mL 溶液以 Bitter-Muir 法测定 HA 含量。以葡萄糖醛酸 (Sigma 公司出品) 为标准品。

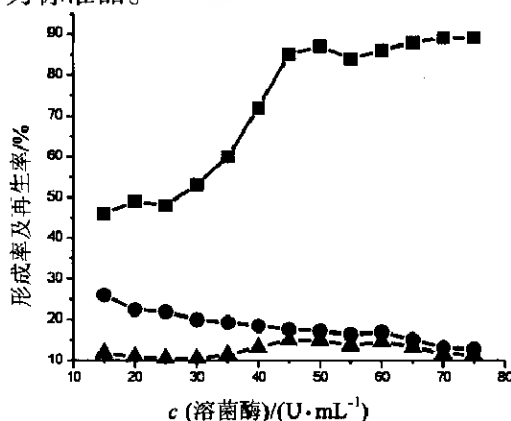


图1 酶浓度对原生质体形成率和再生率的影响

■ 兽疫链球菌原生质体形成率, ● 兽疫链球菌原生质体再生率, ▲ 兽疫链球菌原生质体形成率与再生率的乘积

## 2 结果与讨论

### 2.1 原生质体制备与再生

**2.1.1 酶浓度的影响:** 兽疫链球菌为革兰氏阳性细菌,细胞壁由肽聚糖网状结构交联而成,适宜用溶菌酶脱壁。溶菌酶浓度直接影响原生质体的形成。若浓度太低,难以保证较高的形成率;浓度过高,不利于原生质体的存活及细胞壁的再生,甚至直接裂解细胞。所以最佳酶浓度应综合考虑形成率与再生率,以二者的乘积为参考指标。溶菌酶浓度对原生质体的形成率及再生率的影响如图 1 所示。

由图 1 可知,随酶浓度的升高,形成率上升而再生率下降。当酶浓度为 50U/mL 时,形

成率与再生率乘积最大，该浓度为最佳浓度。

**2.1.2 酶解时间的影响：**酶解时间对原生质体的形成率及再生率的影响如图 2 所示。随酶解时间的增长，原生质体的形成率提高，但 70 min 以后，形成率几乎不再增加，此时原生质体的形成已基本结束，时间的延长已不再显著影响形成率。而再生率则持续缓慢下降，到 150min 时几乎降为零。再生率的下降是由酶解作用积累及原生质体放置时间的增长共同导致。选择形成率与再生率乘积作为指标，确定 60min 为最佳酶解时间。

**2.1.3 渗透压稳定液的选择：**渗透压稳定剂的种类和浓度是维持和控制原生质体数量的主要因素之一<sup>[8]</sup>，同时对裂解酶的活性反应具有一定的影响。本文采用 3 种常用渗透压稳定剂 (0.6mol/L NaCl、0.5mol/L 蔗糖、0.8mol/L 甘露醇) 进行酶解实验。结果如表 1 所示，综合考虑形成率与再生率，0.6mol/L NaCl 作为渗透压稳定液效果最好。

表 1 高渗稳定剂对原生质体形成率的影响

高渗稳定剂	NaCl	蔗糖	甘露醇
浓度 (mol/L)	0.6	0.5	0.8
形成率	80.8%	40.5%	81.4%
再生率	16.9%	19.2%	10.6%
乘积	13.6%	7.8%	8.6%

**2.1.4 甘氨酸预处理的影响：**将兽疫链球菌培养 12h 的菌液经甘氨酸处理后再进行酶解，甘氨酸浓度对原生质体的形成率的影响如图 3 所示。由于溶菌酶溶解细胞壁后会降低菌悬液的浊度，所以随原生质体的增多，菌液的 OD 值变小，即原生质体的形成率可用菌液的 OD 值标示。由图 3 可见随甘氨酸浓度的提高，原生质体的形成率增大，表现为菌液 OD 值的降低，甘氨酸浓度为 1.2% 时原生质体形成率最高。甘氨酸可以提高原生质体形成率是由于在对数生长前期加入的甘氨酸可在细胞壁合成过程中代替 D-丙氨酸掺入细胞壁，从而影响细胞壁网状结构的交联，使其变得疏松。甘氨酸浓度超过 1.2% 后菌悬液 OD 值增加，可能是由于甘氨酸作为营养因子刺激了细胞分裂，造成菌体量的增加。

**2.1.5 高渗预培养的影响：**据报道高渗预培养对提高克鲁维酵母原生质体再生率有重要贡献<sup>[9]</sup>。推测完整菌体对高渗环境的提前适应有利于其对自身生长和代谢系统进行微调，从而在形成原生质体后很快适应高渗体系并顺利进入再生阶段。本文用前述 3 种高渗体系对培养 12~14h 的菌体进行预培养，以未经预培养的为对照组，酶解后计算再生率。结果显示高渗预培养组比对照组再生率普遍提高 10%。此外还发现经高渗预

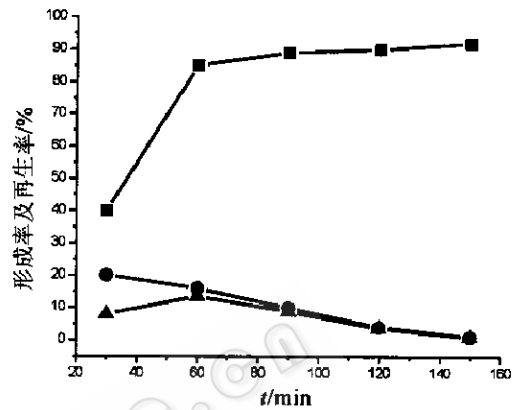


图 2 酶解时间对原生质体形成率和再生率的影响

■ 兽疫链球菌原生质体形成率，● 兽疫链球菌原生质体再生率，▲ 兽疫链球菌原生质体形成率与再生率的乘积

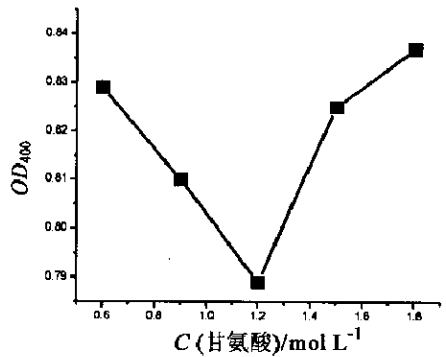


图 3 甘氨酸浓度对兽疫链球菌原生质体形成率的影响

培养的再生时间比对照组缩短4~6h。这表明高渗预培养同样适用于链球菌原生质体的制备。

**2.1.6 原生质体染色：**结晶紫染色法将细胞壁染为深紫色，将细胞质染为浅紫色。酶解前的原始菌株细胞形态如图4所示，呈链球状，细胞壁呈深紫色，细胞质部分呈浅紫色。酶解后形成的原生质体如图5所示，呈现浅紫色，且不呈原先的链球状，由于原生质体膜间有较大吸附趋势而易于粘连聚集成团。从图5还可见，聚集的原生质体团的外缘仍有部分呈深紫色，这表明其正处于酶解过程中，仍有部分细胞壁残留，而裸露的质膜部分则相互粘连。

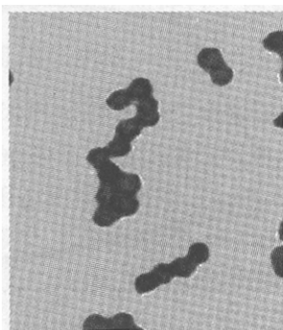


图4 酶解前的兽疫链球菌(400×)

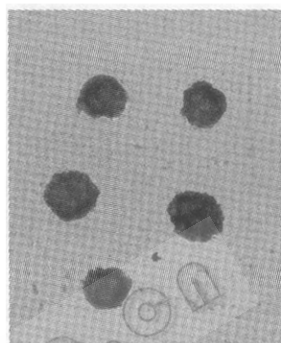


图5 酶解后的兽疫链球菌原生质体(400×)

## 2.2 激光诱变

激光可产生光、热、压力电磁场等效应，作用于微生物细胞时，生物分子吸收光子或在激光的电磁场作用下分子内发生能级跃迁，达到一定的振动能并产生自由基，引起生物分子的分解、断裂，导致分子激活或损伤，在修复过程中有可能发生变异<sup>[10]</sup>。原生质体对激光敏感性较强，可在较小剂量下产生突变，得到较高正突变率。

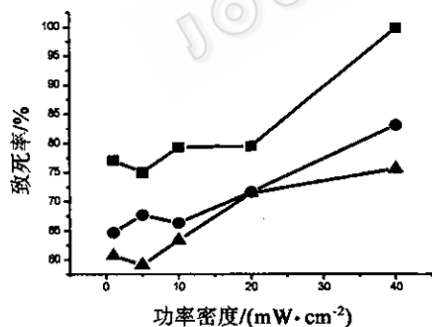


图6 激光功率密度及照射时间  
对致死率的影响

- 激光照射300s后菌体致死率，
- 激光照射120s后菌体致死率，
- ▲ 激光照射60s后菌体致死率

由图6可见，随激光照射时间的延长，每一种功率密度下致死率均上升。当照射时间为300s，功率密度为40mW/cm²时，致死率为99.88%。将存活的菌株经发酵培养，筛选透明质酸高产菌株。

表2 相同激光剂量下的不同致死率

照射剂量 (mJ/cm²)	2400	2400	1200	1200	600	600
照射时间 (s)	120	60	120	60	120	60
功率密度 (mW/cm²)	20	40	10	20	5	10
致死率 (%)	71.66	75.64	66.32	71.45	67.67	63.35

对比相同剂量下的致死率(表2)，可见相同剂量下不同的功率密度和照射时间会引起不同的生物效应。例如照射剂量都是1,200 mJ/cm²时，采用10mW/cm²的功率密度、120s的照射时间，对原生质体的致死率为66.32%；而采用20 mW/cm²的功率密度、60s照射时间，其致死率可达71.45%。

从致死率为99.88%组存活株中挑取34株进行发酵，诱变株与原始株HA的产量比

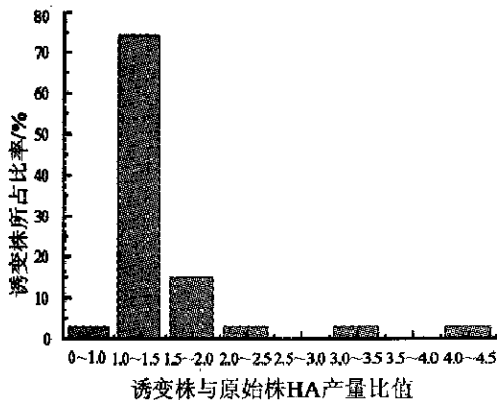


图7 兽疫链球菌诱变株产量分布图

表3 产量分布参数分析

相对产量比值	菌株数	分布频率	变势参数分析
< 1.0	1	2.94	$x = 0.75$
1.0 ~ 1.5	25	73.53	$s = 0.32$
1.5 ~ 2.0	5	14.70	$c_1 = 2.36$
2.0 ~ 2.5	1	2.94	$1/c_1 = 0.42$
3.0 ~ 3.5	1	2.94	$c_3 = 3.25$
4.0 ~ 4.5	1	2.94	$b = 1.04$

$x$  平均产量,  $s$  平均产量的标准差,  $c_1$  产量分布的稳度 ( $x/s$ ),  $c_3$  产量分布的偏度  $\Sigma (x_i - x)^3 / n/s^3$ , 变势  $b = x (6/c_1)^{1/6} (1 + c_3/8)^{1/2}$

值如图7所示, 其变势参数分析见表3。由图7可见, 兽疫链球菌的原生质体经过激光诱变, 存活的菌株其HA产量绝大部分都有所提高, 正突变率达97%。其中产量最高的突变株HA产量达2.21g/L, 为原始株(0.49g/L)的4.5倍。同时由变势参数分析亦可说明: 激光诱变兽疫链球菌的原生质体是获得正突变的有效方法, 这为发酵法生产HA提供了一种获得高产菌株的新途径。

### 参考文献

- [1] Armstrong D C, Johns M R. Appl Environ Microbiol, 1997, **63** (7): 2759~2764.
- [2] Kendall F E, Heidelberger M, Dawson M H. J Biol Chem, 1937, **118** (1): 61~69.
- [3] 赤坂日出道, 驹崎久幸, 柳光男. 日本公开特许公报, 1983, 昭 58 56692.
- [4] Kim J H, Yoo S J, Oh D K, *et al.* Enzyme and Microb Technol, 1996, **19**: 440~445.
- [5] 罗瑞明, 郭美锦, 储 炬, 等. 无锡轻工大学学报, 2003, **22** (1): 56~60.
- [6] 彭益强, 吕凤萍, 贺淹才, 等. 激光生物学报, 2002, **11** (6): 434~437.
- [7] Waltemann M, Luftmann H, Baumeister D, *et al.* Microbiology, 2000, **146**: 1143~1149.
- [8] Hamlyn P F, Bradshaw R W, Mellon F M, *et al.* Enzyme Microbiol Technol, 1981, **3** (4): 321~325.
- [9] 文铁桥, 赵学慧. 微生物学杂志, 1996, **16** (2): 19~22.
- [10] Childs S, Chen J N, Deborah M, *et al.* Development, 2002, **129** (2): 973~982.