

透明质酸生产菌的诱变选育

陈永浩^{1,2} 王强^{1,2*}

(1. 江南大学食品学院 江苏 无锡 214122)

(2. 中国农业科学院农产品加工研究所 农业部农产品加工与质量控制重点开放实验室 北京 100193)

摘要: 以马链球菌为出发菌株, 通过紫外线和 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线辐照诱变, 得到一株无溶血性菌株 NC1150, 并在此基础上继续用 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线辐照诱变得得到产量较高的菌株 NC168, 使透明质酸产量与出发菌株 NC1150 相比提高了 101%, 相对分子量为 0.55×10^6 D, 突变株经过多次传代, 透明质酸产量和相对分子量保持稳定, 溶血性无回复突变现象。

关键词: 马链球菌, 透明质酸, 紫外线诱变, $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线诱变

Mutation and Selection of Hyaluronic Acid-Producing Strains

CHEN Yong-Hao^{1,2} WANG Qiang^{1,2*}

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. Key Laboratory of Agricultural Product Processing and Quality Control, Ministry of Agriculture, Institute of Agro-food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: In this study, a mutant designated NC1150 which dose not produce streptolysin was selected from wild-type *Streptococcus equisimilis* by ultraviolet ray combined with $^{60}\text{Co-}\gamma$ ray mutation. Through further $^{60}\text{Co-}\gamma$ ray mutation a high-producing hyaluronic acid mutant designated NC168 was obtained. This selected mutant NC168 could produce hyluronic acid 1.01 times as much as the original strain NC1150 and relative molecular weight of hyaluronic acid touched 0.55×10^6 D. Furthermore, its hyaluronic acid output and relative molecular weight of hyaluronic acid maintained genetic stability after 10 generations and there was no reverse mutation on hemolysis.

Keywords: *Streptococcus equisimilis*, Hyaluronic acid, Ultraviolet ray mutation, $^{60}\text{Co-}\gamma$ ray mutation

透明质酸(hyaluronic acid, 以下简称 HA)是一种由 D-葡萄糖醛酸和 N-乙酰氨基葡萄糖以 β -1,3 和 β -1,4 糖苷键反复交替连接而成的链状高分子粘多糖^[1]。HA 具有良好的亲水性、生物相容性和保湿功能, 广泛应用于化妆品中, 被誉为天然保湿因子^[2]。在临床上, HA 广泛应用于眼外科手术、治疗骨关节炎、促进伤口愈合, 并具有一定抗癌效果^[3]。

目前, 微生物发酵法由于原料易得、成本低、

所产 HA 有更高的产量和分子量等原因正逐步取代传统的从动物组织中提取 HA, 成为生产 HA 的主要方法^[3]。高产 HA 菌种的选育是提高发酵法生产 HA 产量的先决条件, 能够产 HA 的菌种主要有兽疫链球菌 (*Streptococcus zooepidemicus*) 和马链球菌 (*Streptococcus equisimilis*)^[4], 但原始菌株多具有溶血性、产透明质酸酶或 HA 产率低等缺点, 其中链球菌溶血素有溶解红细胞、杀死白细胞和毒害心脏

* 通讯作者: Tel: 86-10-62815837; ✉: wangqiang365@263.net

收稿日期: 2008-07-08; 接受日期: 2008-10-08

的作用,而透明质酸酶可以将 HA 分解,这些不利因素妨碍了 HA 的工业化生产和广泛应用^[5]。

针对产 HA 的菌株,目前报道的诱变剂主要有紫外线、⁶⁰Co- γ 射线和亚硝基胍(NTG)等^[5],本研究以马链球菌(*Streptococcus equisimilis*)为出发菌,通过紫外线诱变和 ⁶⁰Co- γ 射线诱变相结合的方法对出发菌株进行诱变选育,筛选出无溶血性、HA 产量和分子量均较高的突变株 NC168,为今后进一步研究发酵法生产 HA 打下了基础。

1 材料与方 法

1.1 原始菌株

马链球菌(*Streptococcus equisimilis*):购于国家兽医微生物保藏中心。

1.2 培养基

(1) 种子培养基和发酵培养基:

葡萄糖 20 g,牛心浸粉 4 g,牛脑浸粉 16 g,蛋白胨 10 g, MgSO₄ · 7H₂O 2 g, K₂HPO₄ 2 g,加水定容至 1 L,调 pH 7.2, 1×10⁵ Pa 灭菌 15 min。

(2) 固体培养基:

葡萄糖 1 g,牛心浸粉 4 g,牛脑浸粉 16 g,酵母膏 10 g,琼脂 20 g,加水定容至 1 L,调 pH 7.2, 1×10⁵ Pa 灭菌 15 min。

(3) 血琼脂平板:购于北京军区联勤部。

1.3 主要仪器和药品

FT-IR 红外分析仪:美国 Thermo Electron 公司;紫外-可见分光光度计:北京 BRAIC 公司;扫描电子显微镜:日本 Hitachi 公司;⁶⁰Co- γ 射线源:北京大学化学学院提供;十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)为分析纯;透明质酸标准品为医药级,购于诺维信公司。

1.4 实验方法

1.4.1 出发菌株的确定:马链球菌菌株经活化后,接种至发酵培养基进行发酵,将发酵液离心去除菌体,上清液用 2.5 倍无水乙醇进行分离纯化,沉淀经干燥后,分析发酵产物结构。

1.4.2 菌株生长曲线的测定:挑取在斜面培养基上培养 24 h 的菌株,在 37°C 下 180 r/min 振荡培养 12 h 进行一级种子培养,再以 10%接种量接入新鲜种子培养基中,进行二级种子培养,测定生长曲线,每隔 2 h 取种子培养液测定生物量。

1.4.3 菌株的前培养:将二级种子液培养至对数期,

置于 4°C 同步诱导 1 h,取经过低温同步诱导的种子液,以 20%的接种量转接至新鲜的种子培养基,37°C 振荡培养 1 h,使细胞处于同步生长状态,然后置于冰浴中保持 10 min^[6]。

1.4.4 单菌悬液的制备:将冰浴处理后的种子液,以 4200 r/min 离心 10 min,倒出上清液后加入等量的无菌生理盐水,振荡混匀菌体后,取 15 mL 菌液至无菌三角瓶,瓶内装有灭菌玻璃珠,振荡 10 min 以确保所得为单菌悬浮液。

1.4.5 紫外诱变:紫外线诱变在暗室中进行,诱变后的操作在红灯下完成:(1) 预热紫外灯:紫外灯功率 20 W,照射距离 30 cm,照射前打开紫外灯预热 20 min,使紫外线强度稳定。(2) 加菌液:选取若干套内置玻璃珠的 5 cm 无菌培养皿,在无菌条件下分别加入 3 mL 已制备好的菌悬液和磁力搅拌棒,置于距紫外灯 30 cm 处的磁力搅拌器上。(3) 照射:启动磁力搅拌器,打开培养皿盖的同时打开紫外灯,开始计算时间,分别照射一定时间后,关闭紫外灯结束诱变,并立即盖上培养皿的盖,悬浮液照射后在暗室内进行后培养,以避免光复活对诱变的影响。(4) 突变株分离:将经过诱变的菌液进行系列稀释,涂布于血平板,37°C 培养 24 h,挑取溶血性弱或无溶血性的菌落,进行下一轮诱变。

1.4.6 ⁶⁰Co- γ 射线辐照诱变:将 10 mL 单菌悬液置于无菌试管中,选用剂量率为 31.42 Gy/min 的 ⁶⁰Co- γ 射线照射一定时间,经过后培养,将菌液进行系列稀释,涂布血平板筛选无溶血性突变株,涂布琼脂平板筛选高产突变株。将 HA 产量为出发菌株 95%及以下的菌株作为负突变株,105%及以上的菌株为正突变株,95%~105%之间为不变异株^[7]。

1.4.7 致死率的计算:将未经紫外线或 ⁶⁰Co- γ 射线照射的菌悬液与经过照射不同时间的菌悬液分别进行系列稀释,并涂布固体培养基平板,培养 24 h 后进行菌落计数,计算致死率。

致死率=(未照射平板菌落数 - 照射平板菌落数)/未照射平板菌落数

1.4.8 后培养:菌液经过诱变处理后 1 h 内倒入新鲜的种子培养基中,混匀,37°C 静置培养 3 h^[6]。

1.5 测定方法

HA 含量的测定^[8]:将发酵液以 4200 r/min 离心 15 min,取上清液 1 mL,加入 2.5 倍体积无水乙醇,混匀后在 4°C 下静置 1 h,离心取沉淀,加入 5 mL

去离子水溶解沉淀,采用 CTAB 浊度法测定 HA 含量。

HA 相对分子量的测定^[9]:采用 0.54 mm 的乌氏粘度计于 25°C 测定黏度,参比液为 0.2 mol/L NaCl 溶液,根据下式计算特性黏数:

$[\eta] = \ln \eta_r / c$, 然后按经验公式计算 HA 平均相对分子量, $[\eta] = 0.036 Mr^{0.78}$ 。

式中: η_r 为待测液的流出时间(T_i)溶剂流出时间(T_0)的比值,即 $\eta_r = T_i / T_0$; c 为供试 HA 溶液的浓度,单位为 kg/L; $[\eta]$ 单位为 cm^3/g ; Mr 为平均相对分子量,单位 D。

生物量的测定:菌液摇匀后测定光密度 OD_{640} 。

2 结果与分析

2.1 出发菌株的确定

发酵产物经分离纯化后,以溴化钾压片,用红外分光光度计对其扫描 $4000\text{ cm}^{-1} \sim 400\text{ cm}^{-1}$ 吸收光谱并与 HA 标准品红外光谱进行比较,由图 1 可见,发酵液纯化产物产生吸收带的位置与 HA 标准品的吸收带位置一致,在 3400 cm^{-1} 附近有强的 O—H 伸缩振动的特征吸收,表明有多羟基结构;在 2900 cm^{-1} 附近有 $-\text{CH}_2$ 的伸缩振动; $1560\text{ cm}^{-1} \sim 1620\text{ cm}^{-1}$ 附近有 CO、CN 的伸缩振动,表明存在着酰胺基结构; 1400 cm^{-1} 处有羧基中的 O—H 的伸缩振动,表明原始菌株的产物呈较典型的 HA 红外吸收特征,具有多糖的羟基、乙酰氨基及羧基结构,与 HA 重复单位中的乙酰氨基葡萄糖、葡萄糖醛酸一致。因此,以该菌株作为诱变的出发菌株。

2.2 出发菌株诱变菌龄的确定

经过二级种子培养,得到出发菌株的生长曲

线。由图 2 的生长曲线可见,在培养的前 5 h 为菌种的延迟期,在第 5 h~8 h 为对数增长期,在 8 h 以后进入恒定期。二级种子培养后的第 7 h~8 h 为菌种对数增长期的后期,适宜进行诱变,因此选择二级种子培养 7 h~8 h 作为出发菌株诱变适宜的菌龄。

2.3 不同诱变剂的致死率曲线

出发菌株经紫外线照射的致死率曲线如图 3 所示,紫外线照射 60 s 的致死率为 87.1%,照射 70 s 的致死率达到 90.4%,照射 90 s 的致死率为 99.6%。

出发菌株经 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线照射的致死率曲线如图 4 所示, $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线照射剂量为 100 Gy 时的致死率为 76.5%,200 Gy 时的致死率 81.9%,400 Gy 时的致死率为 99.9%。

2.4 无溶血性突变株 NC1150 的获得

在血平板上出发菌株单菌落周围有透明的溶血环。首先用紫外线照射 60 s 对出发菌株进行诱变,经三轮诱变后,获得溶血性较弱的菌株 NC1100,其单菌落周围溶血环变小。然后选择致死率较高的 400 Gy 照射剂量的 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线对突变株 NC1100 进行处理,最终获得了无溶血性的突变株 NC1150,单菌落周围的溶血环消失。

图 5 为出发菌株和经过 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线辐照诱变获得的无溶血性突变株 NC1150 的扫描电镜照片,从图 5A 可以看出,出发菌株单细胞为卵圆形,而图 5B 显示突变株 NC1150 菌体单细胞已接近圆形,并且体积略有增大,原因可能是通过诱变后的菌体遗传物质发生了较大变化,导致在单细胞形态上也发生了细微变化。

2.5 透明质酸高产突变株的获得

以无溶血性的突变株 NC1150 为出发菌株,采

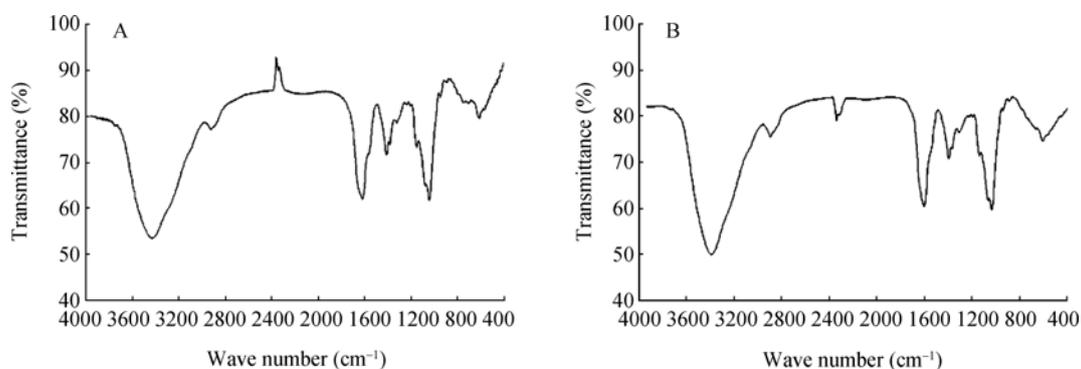


图 1 红外谱图的分析对比

Fig. 1 Analysis and comparison of infrared spectrums

注: A: HA 标样; B: 发酵液纯化产物。

Note: A: HA standard; B: Extract of fermentation broth.

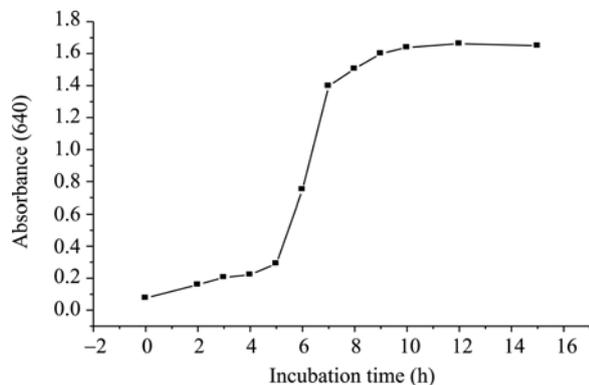


图2 出发菌株的生长曲线
Fig. 2 Growth curvature of original strain

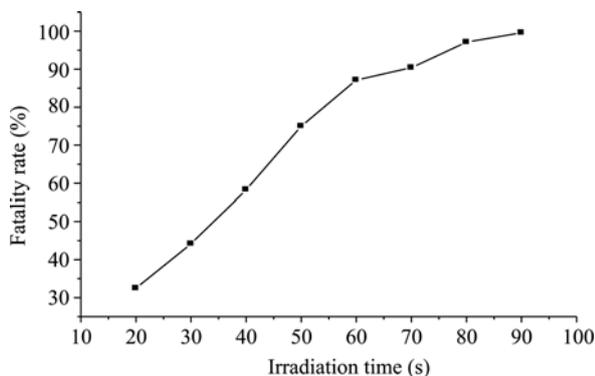


图3 紫外诱变的致死率曲线
Fig. 3 Fatality rate curvature of ultraviolet ray mutagenesis

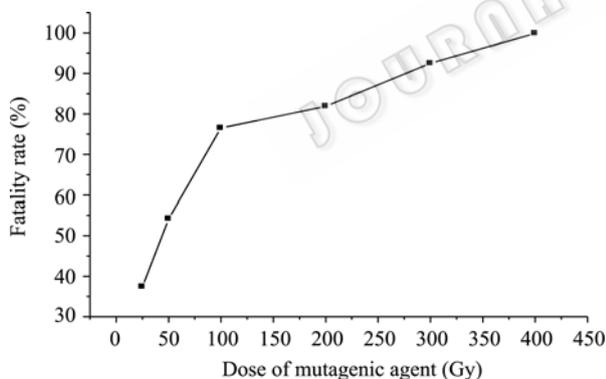


图4 ^{60}Co - γ 射线诱变致死率曲线
Fig. 4 Fatality rate curvature of ^{60}Co gamma-ray mutagenesis

用 ^{60}Co - γ 射线继续进行诱变, 选择致死率为 76.5% 的 100 Gy 的照射剂量。诱变结束后, 经后培养的菌株系列稀释后, 涂布琼脂平板, 37°C 培养 24 h, 随机挑选 215 株菌株进行试管保藏, 并分 4 批进行初筛, 每个菌株接一个摇瓶进行发酵, 测定 HA 产量。结

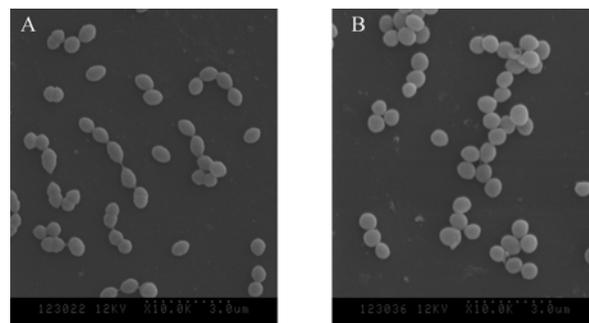


图5 诱变前后菌体扫描电镜照片(10000 \times)
Fig. 5 Scanning electron micrographs of thalli before and after mutagenesis(10000 \times)

注: A: 出发株; B: 突变株.

Note: A: Original strain of *Streptococcus equisimilis*; B: Mutant strain NC1150.

果表明, ^{60}Co - γ 射线 100 Gy 照射剂量诱变的正突变率为 28.24%, 负突变率为 42.72%, 初筛获得产量较高的 34 株菌, 其中 12、74、149、150、168、194 等 6 株菌 HA 的产量超过了 90 mg/L, 结果见表 1。

对上述菌株进行复筛, 首先经过种子培养, 再进行发酵培养, 每个菌株做 3 次重复。第 1 次复筛从上述 34 个菌株中筛选出产量较高的 10 个菌株, 再对这 10 个菌株进行第 2 次复筛, 获得产量较高的 49、74、168、194 等 4 个菌株, 分别测定其 HA 产量、分子量和发酵培养后的生物量, 由表 2 可见, 168 号菌株的上述各项指标均高于其它菌株。

2.6 传代稳定性试验

对复筛获得的 4 个产量较高的菌株进行稳定性试验, 每株菌经过传代后, 首先进行种子培养, 再进行摇瓶发酵培养, 共传代 10 次, 分别测定不同菌株传代后的 HA 产量、分子量的变化情况, 并经过系列稀释后涂布血平板。4 株菌多次传代涂布血平板后, 单菌落周围均未出现溶血环, 表明所获得的溶血性缺陷型菌株无回复突变现象。

由图 6 可见, 168 号菌株经发酵培养后, 其 HA 产量一直保持在 150 mg/L 以上, 而 49、74、194 号菌株在传至第 6 代时, HA 产量出现了不同程度的下降, 当传代至第 10 代时, 49 和 74 号菌株的 HA 产量降至 100 mg/L 以下。

图 7 表明, 4 株菌在经过传代后, 所产 HA 的分子量均有所降低, 168 号菌株在传至第 6 代时, 所产 HA 的分子量略有上升, 并在各菌株中一直保持较高的水平。因此, 将 168 号菌株确定为目标菌株, 命名为 NC168 号菌株, 并进行冻干保藏。

表 1 ^{60}Co - γ 射线辐照诱变高产菌株初筛结果
Table 1 Results of preliminary selection on higher HA-producing mutant by ^{60}Co gamma-ray mutagenesis

编号 Serial number	HA 产量 Output (mg/L)						
对照 C	74.93	35	80.69	100	81.6	171	79.40
1	83.63	48	79.88	121	84.2	173	86.14
4	82.98	49	79.06	149	102.5	174	81.08
6	80.04	56	78.73	150	104.2	175	81.81
9	80.04	63	87.23	151	78.6	177	78.68
12	92.62	65	84.86	153	79.4	181	84.21
14	88.86	74	90.07	166	81.8	194	92.15
23	87.55	93	78.68	167	86.1	213	86.14
27	84.94	99	83.89	168	99.8		

表 2 ^{60}Co - γ 射线辐照诱变高产菌株复筛结果
Table 2 Results of refined selection on higher HA-producing mutant by ^{60}Co gamma-ray mutagenesis

编号 Serial number	HA 产量 Output (mg/L)	分子量 Mr (10^6 D)	生物量 Biomass (OD_{640})	编号 Serial number	HA 产量 Output (mg/L)	分子量 Mr (10^6 D)	生物量 Biomass (OD_{640})
49	122.91	0.533	0.898	168	150.61	0.677	1.196
74	130.79	0.62	1.013	194	144.08	0.612	1.008

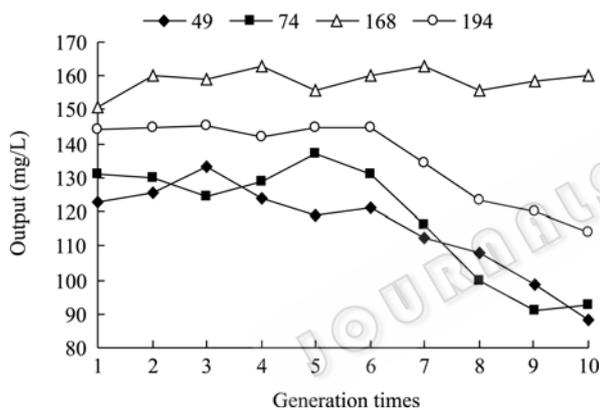


图 6 传代后 HA 产量变化情况
Fig. 6 HA output history after strains were subcultured

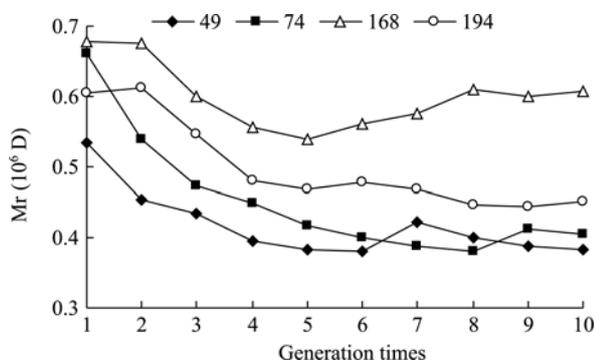


图 7 传代后 HA 分子量变化情况
Fig. 7 Mr history of HA after strains were subcultured

3 讨论

本研究选择马链球菌为出发菌株。在血琼脂平板上, 单菌落溶血环明显, 表明红细胞被完全溶解。HA 生产的安全性至关重要, 不产生毒素的生产菌株既可以避免生产过程中偶然泄漏对人体健康造成的危害, 也可以大大降低分离纯化过程的成本。因此, HA 生产菌的诱变首先要得到无溶血性的突变株。

目前报道的用作产 HA 菌株的诱变剂主要有紫外线、 γ 射线、亚硝基胍(NTG)等^[5], 为了使变异株稳定, 不易发生回复突变, 诱变剂应使遗传物质发生较大变化。亚硝基胍和甲基磺酸乙酯多数是引起碱基对置换, 得到的突变株回复突变率高, 而电离辐射、紫外线等物理诱变剂能引起碱基对缺失、码组移动等遗传物质的巨大损伤, 不易产生回复突变^[6]。另外, 在操作过程中, 紫外线和 ^{60}Co - γ 射线辐照诱变还具有安全、无毒、无污染等优点。在本研究中, 采用紫外线与 ^{60}Co - γ 射线辐照相结合的方法对马链球菌进行诱变, 得到无溶血性、产量较高的菌株 NC168, HA 产量和分子量传代稳定, 取得了较好的诱变效果。

对于诱变剂量的选择, 在以去除菌株溶血性为

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

目的诱变中,紫外线处理选择的是致死率为 87.1% 诱变剂量, $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线辐照诱变首先选择致死率 99.9% 的诱变剂量。较高的诱变剂量有利于引起遗传物质较大的损伤,获得突变株,并促使突变株稳定^[6]。诱变结果表明,经过多次传代后溶血性消失的突变株未出现回复突变现象,电镜照片显示菌体单细胞在形态上发生了细微变化。有研究表明,在进行以高产为目标的诱变中,正突变多出现在偏低剂量中,而负突变则多出现在偏高剂量中^[6],因此,在对菌株 NC1150 进行提高产量的诱变时, $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线辐照处理选择了致死率为 76.5% 的诱变剂量。

对于 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线辐照剂量率, $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线诱发的 DNA 损伤中几乎不存在剂量率效应^[10]。 γ 射线通过产生具有很高能量的次级电子产生电离作用,其直接效应是造成糖苷键、磷酸二氢键的断裂,间接效应是电离辐射使水或有机分子产生自由基,自由基作用于 DNA 分子,引起缺失或损伤。孔福全等的研究表明^[10],随着 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线剂量率的增加,平均每个 DNA 上的双链断裂数出现没有规律的变化,并且变化甚微,剂量率的变化对于自由基的产生没有明显影响。因此,本研究统一选择了 31.42 Gy/min 的剂量率。

国内外关于 HA 生产菌株诱变选育的报道,多以兽疫链球菌为出发菌株^[11-14]。Kim 等人用 NTG 诱变兽疫链球菌得到高产菌株,发酵罐发酵产量为 6 g/L~7 g/L^[11],国内发酵罐发酵产量多为 2 g/L~5 g/L^[5,15]。本研究以马链球菌为出发菌株进行诱变,在摇瓶发酵条件下,突变株 NC168 的 HA 产量与出发菌株相比提高了 1 倍,经 2.5 L 发酵罐发酵,HA 产量接近 3 g/L。本实验室发酵条件优化工作正在进行,预期在优化的发酵条件下 HA 产量将进一步提高。

参 考 文 献

- [1] Rapport MM, Weissman B, Linker A, *et al.* Isolation of a crystalline disaccharide, hyalobiuronic acid from hyaluronic acid. *Nature*, 1951, **168**: 996-997.
- [2] 安海平, 姚敏杰, 陈玉铭, 等. 透明质酸发酵法制备. *江苏食品与发酵*, 1995, **1**: 1-4.
- [3] 潘红梅. 透明质酸的研究现状综述. *四川食品与发酵*, 2003, **1**: 5-9.
- [4] 鲁念慈, 谭天伟. 透明质酸的制备及其应用. *功能高分子学报*, 2001, **14** (3): 370-376.
- [5] 石艳丽, 郭学平, 奕贻宏. 产透明质酸菌的育种概况. *食品与药品*, 2006, **8** (10A): 22-24.
- [6] 诸葛健, 李华钟. *微生物学*. 北京: 科学出版社, 2004, pp.297-409.
- [7] 霍长河, 曹海峰, 刘成琴, 等. ^{60}Co 照射在链霉菌生产选育中的应用. *中国抗生素杂志*, 2005, **30** (3): 169-170.
- [8] Nicola DF. Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 1955, **10**: 303-306.
- [9] 顾其胜, 严 凯. *透明质酸与临床医学*. 上海: 第二军医大学出版社, 2003, pp.84-86.
- [10] 孔福全, 王 潇, 倪岷楠, 等. γ 射线诱导 DNA 损伤中 DNA 浓度和剂量率的影响. *原子核物理评论*, 2007, **24** (2): 103-106.
- [11] Kim JH, Yoo SJ, Oh DK, *et al.* Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid. *Enzyme and Microb Technol*, 1996, **19**: 440-445.
- [12] 滕利荣, 刘岩厚, 张 佳, 等. 兽疫链球菌原生质体激光诱变及高产菌株筛选. *微生物学通报*, 2004, **31**(1): 40-45.
- [13] 罗瑞明, 郭美锦, 储 炬, 等. 高产、大分子透明质酸突变菌株 NUF-036 的选育. *无锡轻工大学学报*, 2003, **22**(2): 14-17.
- [14] 罗 强, 孙启玲. 原生质体诱变选育透明质酸菌株及发酵条件的优化. *四川大学学报(自然科学版)*, 2003, **40**(5): 949-952.
- [15] 张淑荣, 许伟坚, 张 鹏, 等. 发酵法生产透明质酸菌种的选育. *北京化工大学学报*, 1999, **26**(1): 1-4.