

文章编号 :1009-038X(2003)01-0056-05

# 生产透明质酸的兽疫链球菌 NUF-035 的筛选 及摇瓶发酵条件

罗瑞明<sup>1</sup>, 郭美锦<sup>2</sup>, 储炬<sup>2</sup>, 张嗣良<sup>2</sup>

(1. 宁夏大学农学院, 宁夏银川 750004; 2. 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:**从肺炎患羊的肺叶中取得微生物, 经菌落分离、镜检、生化反应鉴定, 分离出兽疫链球菌。通过正交实验确定摇瓶培养最优培养基为: 葡萄糖 60 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 酵母抽提物 10 g/L,  $K_2HPO_4$  2.0 g/L,  $(NH_4)_2SO_4$  5.0 g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g/L。筛选出 *Streptococcus zooepidemicus* NUF-035 菌株, 该菌产生的粗品透明质酸的相对分子质量为  $2.11 \times 10^6$ , 产量达 1.88 g/L。

**关键词:**兽疫链球菌 NUF-035; 发酵条件; 透明质酸

中图分类号: TQ 920.6

文献标识码: A

## The Study on the Screening for Hyaluronic Acid Producer *Streptococcus zooepidemicus* NUF-035 and Its Fermentation Technologies in Shake-Flask Culture

LUO Rui-ming<sup>1</sup>, GUO Mei-jin<sup>2</sup>, CHU Ju<sup>2</sup>, ZHANG Si-liang<sup>2</sup>

(1. Agricultural College, Ningxia University, Yinchuan 750004, China; 2. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract:** *Streptococcus zooepidemicus*, a hyaluronic acid (HA) producer, was isolated and screened from the lobe of lungs of sheep infecting pneumonia and identified by biochemical reactions. The optimum medium in shake-flask culture was obtained through orthogonal experiment: glucose 60 g/L, peptone 10 g/L, yeast extract 10 g/L,  $K_2HPO_4$  2.0 g/L,  $(NH_4)_2SO_4$  5.0 g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g/L. The strain *Streptococcus zooepidemicus* NUF-035 was obtained, the molecular weight of the raw HA produced by strain NUF-035 was 2 110 000, and the HA concentration could reach 1.88 g/L.

**Key words:** *Streptococcus zooepidemicus* NUF-035; fermentation conditions; hyaluronic acid (HA)

透明质酸(Hyaluronic acid, Hyaluronan, 简称 HA), 又名玻璃酸, 它是由(1-3)-2-乙酰氨基-2-脱氧- $\beta$ -D-葡萄糖与(1-4)-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸双糖重复单位所组成的直链粘多糖<sup>[1]</sup>。透明质酸分子在溶液中

高度伸展与随机卷曲构型使其占有很大区域, 其流体力学体积较未水化时大 1 000 倍。而且分子链之间互相缠绕形成连续网络结构, 水分子通过极性键与其直接作用, 使得透明质酸象“分子海绵”一样,

收稿日期 2002-05-10; 修回日期 2002-11-28.

基金项目: 宁夏回族自治区教委科研基金项目(0102)资助课题.

作者简介: 罗瑞明(1964-), 男, 宁夏银川人, 生物化工专业硕士研究生, 副教授.

可以吸收并保持其自身质量千倍以上的水分,是国际上公认的最好的保湿剂<sup>[2]</sup>。

因为透明质酸具有保湿、营养、润肤等作用,故其广泛地用于各种高级化妆品中,与传统的保湿剂相比,透明质酸具有更高的保湿效果,且无油腻和阻塞皮肤等缺点。当 HA 加入化妆品中涂于皮肤表面时,会形成一层粘弹性透明水化膜,这层膜具有很好的保水作用,就象天然存在于细胞间质中的 HA 一样,能增加皮肤角质层的水分,而角质层的水分与维持皮肤健康和外界刺激的防御机能密切相关。作为一种天然降解且具有吸收性的生物学材料,透明质酸在临床上用途十分广泛。HA 制剂在临床应用中有 3 种剂型:液体喷雾、胶体涂布及薄膜覆盖。可以广泛应用于眼科、耳科、骨科和普外科等,并已经取得令人满意的效果<sup>[3]</sup>。研究证明,产透明质酸的部位是链球菌的荚膜<sup>[4]</sup>。作者从肺炎患羊的肺叶中取得微生物,经菌落分离、镜检、生化反应鉴定,分离出兽疫链球菌。通过正交摇瓶实验确定最优培养基,并筛选出较优菌株。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 原始菌** 从肺炎羊肺中取样。宰杀肺炎患羊,将羊胸腔剃毛,涂抹医用酒精进行消毒,用消毒兽用手术刀切开羊胸腔,取出羊肺,用自来水洗去羊血,在羊肺外表面红肿处用医用棉擦破表皮组织取样,迅速抹在准备好的平皿 1 上,编号为 01000。用抽血注射器在羊肺中取血注入平皿 2 上,编号为 02000。用消毒手术刀切开肺叶炎症明显处,取中间一小块组织在平皿上涂抹,编号为 03000。

**1.1.2 实验材料** 蛋白胨,酵母抽提物,琼脂,硫酸铵,碳酸氢钠,硫酸镁,磷酸氢二钾,丙三醇,无水乙醇,酒石酸钾钠,苯甲酸,亚硫酸钠,葡萄糖醛酸内酯,硫酸,氯化钠,氢氧化钠,吡唑,3,5-二硝基水杨酸,精密 pH 试纸(5.5~9.0),DNS 试剂,中性甲醛溶液,5 mol/L 的 NaOH,0.1 mol/L 的 NaOH,0.05% 的溴麝香草酚蓝溶液,0.5% 的酚酞乙醇溶液,0.4 mol/L 的 NaCl,1% 的氯化烷基吡啶,0.9% 的生理盐水。

**1.1.3 仪器及设备** 温控摇床,显微镜 1 台,超净工作台 1 台,电热手提压力蒸汽消毒器 1 个,接种针 3 个,9 cm 玻璃平板 50 个,15 mm × 150 mm 试管 200 支。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 分离纯化程序** 采样→平皿培养→三角瓶

培养→菌落分离→划线分离→初筛菌株。

### 1.2.2 兽疫链球菌的诊断方法

1) 镜检。

2) 兽疫链球菌的生化反应鉴定:包括溶血实验,山梨醇、乳糖发酵实验和淀粉水解实验<sup>[5,6]</sup>。

**1.2.3 菌株的摇瓶发酵** 试管斜面→种子培养基(35℃培养 24 h)→各种发酵培养基(35℃,200 r/min 培养 36 h)。

**1.2.4 HA 产量、相对分子质量测定方法** 见文献[8]。

## 2 结果与讨论

产生透明质酸的菌落透明度很高,隆起,呈水滴状,色泽近似蛋清,菌落选择以此为依据。

### 2.1 原始菌落的分离结果

原始菌落经平皿培养,接入三角瓶液体培养基,经无菌水稀释 10<sup>4</sup> 倍后,分别接入 3 个平皿,于 35℃培养 48 h 后,02000 号无明显透明和隆起菌落,故弃去。01000,03000 有近似特征菌落出现,划线分离。

### 2.2 二次分离结果

从 01000,03000 号平板中各挑 8 个菌,菌号为 01100-01800,03100-03800。培养后发现其中 01200,01700,03500 菌株的透明度很高,菌落隆起,呈水滴状,色泽近似蛋清,继续划线分离培养,编号为 01210-01280,01710-01780,03510-03580。

### 2.3 三次分离结果

对 01210-01280 号菌株镜检,01260 号菌落中无其它杂菌,很符合兽疫链球菌形态特征。对 01710-01780 号菌镜检,01770 最好。对 03510-03580 镜检,03540 号最好。

### 2.4 四次分离结果

将 01260,01770,03540 菌落继续划线分离,编号分别为 01261-01268,01771-01778,03541-03548,继续培养。

### 2.5 生化反应鉴定

培养后对第四次分离的 24 个菌株进行生化反应鉴定,结果见表 1。

### 2.6 兽疫链球菌确定

01266(M<sub>1</sub>),01777(M<sub>2</sub>),03542(M<sub>3</sub>)由镜检、生化特征反应诊断为兽疫链球菌,将其作为初筛菌株,进一步进行摇瓶实验复筛,根据其产透明质酸能力确定三者中一者为诱变出发菌株。

10263,01775,03541,03545 这 4 个菌无链球菌形态特征,为杂菌。01263,01267,01268,01771,

01778 03543 03547 这6个菌溶血非B型,虽为链球菌,但并非为所需要的兽疫链球菌.其它11个菌为革兰氏阳性链球菌的其它菌群,从菌群透明隆起特征看,它们可能产生透明质酸,但兽疫链球菌为C群链球菌,非人体致病菌,应首选.

表1 初筛菌的生化反应

Tab.1 Biochemical reactions for isolated strains

| 菌号    | 是否具有兽疫链球菌形态 | 革兰氏染色 | 溶血β | 山梨醇 | 乳糖 | 水解淀粉 |
|-------|-------------|-------|-----|-----|----|------|
| 01261 | +           | +     | +   | -   | -  |      |
| 01262 | +           | +     | +   | -   | +  |      |
| 01263 | -           | +     |     |     |    |      |
| 01264 | +           | +     | +   | -   | -  |      |
| 01265 | +           | +     | +   | +   | ±  | -    |
| 01266 | +           | +     | +   | +   | +  | +    |
| 01267 | +           | +     | -   | +   | +  | -    |
| 01268 | +           | +     | -   |     |    |      |
| 01771 | +           | +     | -   |     |    |      |
| 01772 | +           | +     | +   | -   | -  |      |
| 01773 | +           | +     | +   | -   | -  |      |
| 01774 | +           | +     | +   | -   | +  |      |
| 01775 | -           | -     |     |     |    |      |
| 01776 | +           | +     | +   | -   | -  |      |
| 01777 | +           | +     | +   | +   | +  | +    |
| 01778 | +           | +     | -   |     |    |      |
| 03541 | -           | +     |     |     |    |      |
| 03542 | +           | +     | +   | +   | +  | +    |
| 03543 | +           | +     | -   |     |    |      |
| 03544 | +           | +     | -   |     |    |      |
| 03545 | -           | -     |     |     |    |      |
| 03546 | +           | +     | +   | -   | -  |      |
| 03547 | +           | +     |     | -   |    |      |
| 03548 | +           | +     | +   | -   | +  |      |

注:表中+表示“是”或“有”,“-”表示“否”或“无”.

2.7 正交实验结果

保持温度(35℃)转速(200 r/min)不变,对菌株、培养基、装量进行正交试验.发酵开始后,每隔4h用1 mol/L NaHCO<sub>3</sub>溶液调pH至7.5~8.0.其因素水平差异以及实验设计与结果计算见表2,3.由因素水平表,在常用正交表中找出正交表L<sub>18</sub>(6<sup>1</sup>3<sup>3</sup>)<sup>[9]</sup>,设计与结果计算见表3.

从表3中极差R<sub>i</sub>的大小可以判断因素对HA相对分子质量影响的主次,R<sub>i</sub>越大,表示第i号因素对指标的影响越大.反之,R<sub>i</sub>越小,表示第i号因素对指标的影响越小.13号实验的相对分子质量最大,但考虑到产量,放弃13号,故选择17号.影响因素从大到小为:B(菌株)>C(装量)>A(葡萄糖)>E[(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>]>F(酵母提取物)>G(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)>D(蛋白胨).

根据极差计算,A<sub>6</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>1</sub>E<sub>3</sub>F<sub>3</sub>G<sub>2</sub>(下标数字分别为各因素水平)为首选方案,即采用M<sub>2</sub>为诱变出发菌株,葡萄糖质量浓度60 g/L,蛋白胨质量浓度10 g/L,酵母抽提物质量浓度10 g/L,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>质量浓度2.0 g/L,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>质量浓度5.0 g/L,装液量为250 mL三角瓶为20 mL.另加0.5 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O促进发酵.对A<sub>6</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>1</sub>E<sub>3</sub>F<sub>3</sub>G<sub>2</sub>继续做改进实验:1)提高葡萄糖浓度至80 g/L,相对分子质量和产量均无提高.故确定葡萄糖用量继续采用60 g/L.2)M<sub>1</sub>与M<sub>2</sub>所产HA相对分子质量接近,但M<sub>2</sub>所产HA产量高于M<sub>1</sub>,故菌种仍然采用M<sub>2</sub>.3)将蛋白胨用量提高至15 g/L,相对分子质量和产量无明显变化.4)将转速从200 r/min提高到300 r/min,产量有所增加,因而转速为300 r/min.

表2 因素水平表

Tab.2 The levels of factors of orthogonal experiment design

| 水平 | 葡萄糖质量浓度/(g/L)<br>A | 菌株<br>B        | 250 mL装液量/mL<br>C | 蛋白胨质量浓度/(g/L)<br>D | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 质量浓度/(g/L)<br>E | 酵母抽提物质量浓度/(g/L)<br>F | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 质量浓度/(g/L)<br>G |
|----|--------------------|----------------|-------------------|--------------------|---|----------------------|---|
| 1  | 10                 | M <sub>1</sub> | 10                | 10                 | 0   | 6.0                  | 0   |
| 2  | 20                 | M <sub>2</sub> | 20                | 8.0                | 2.5   | 8.0                  | 2.0   |
| 3  | 30                 | M <sub>3</sub> | 30                | 6.0                | 5.0   | 10                   | 4.0   |
| 4  | 40                 |                |                   |                    |   |                      |   |
| 5  | 50                 |                |                   |                    |   |                      |   |
| 6  | 60                 |                |                   |                    |   |                      |   |

表 3 正交实验结果

Tab.3 The results of orthogonal experiment

| 实验号               | 因 素                        |                    |                           |                            |  |                              |  | 相对分子质量<br>( $\times 10^6$ ) | 产量/<br>(g/L) |
|-------------------|----------------------------|--------------------|---------------------------|----------------------------|--|------------------------------|--|-----------------------------|--------------|
|                   | 葡萄糖<br>质量浓度/<br>(g/L)<br>A | 菌株<br>B            | 250 mL<br>装液量/<br>mL<br>C | 蛋白胨<br>质量浓度/<br>(g/L)<br>D | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>质量浓度/<br>(g/L)<br>E | 酵母抽提物<br>质量浓度/<br>(g/L)<br>F | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>质量浓度/<br>(g/L)<br>G |                             |              |
| 1                 | 1(10)                      | 1(M <sub>1</sub> ) | 3(30)                     | 2(8.0)                     | 2(2.5)   | 1(6.0)                       | 2(0)   | 1.95                        | 0.672        |
| 2                 | 1                          | 2(M <sub>2</sub> ) | 1(10)                     | 1(10)                      | 1(0)   | 2(8.0)                       | 1(2.0)   | 1.43                        | 0.825        |
| 3                 | 1                          | 3(M <sub>3</sub> ) | 2(20)                     | 3(6.0)                     | 3(5.0)   | 3(10)                        | 3(4.0)   | 0.87                        | 0.753        |
| 4                 | 2(20)                      | 1                  | 2                         | 1                          | 2  | 3                            | 1  | 2.11                        | 0.962        |
| 5                 | 2                          | 2                  | 3                         | 3                          | 1  | 1                            | 3  | 2.04                        | 1.012        |
| 6                 | 2                          | 3                  | 1                         | 2                          | 3  | 2                            | 2  | 1.25                        | 0.893        |
| 7                 | 3(30)                      | 1                  | 1                         | 3                          | 1  | 3                            | 2  | 1.89                        | 1.124        |
| 8                 | 3                          | 2                  | 2                         | 2                          | 3  | 1                            | 1  | 1.96                        | 0.976        |
| 9                 | 3                          | 3                  | 3                         | 1                          | 2  | 2                            | 3  | 1.77                        | 0.918        |
| 10                | 4(40)                      | 1                  | 1                         | 1                          | 3  | 1                            | 3  | 1.37                        | 1.231        |
| 11                | 4                          | 2                  | 2                         | 3                          | 2  | 2                            | 2  | 1.69                        | 1.612        |
| 12                | 4                          | 3                  | 3                         | 2                          | 1  | 3                            | 1  | 1.26                        | 1.077        |
| 13                | 5(50)                      | 1                  | 3                         | 3                          | 3  | 2                            | 1  | 2.11                        | 1.123        |
| 14                | 5                          | 2                  | 1                         | 2                          | 2  | 3                            | 3  | 1.75                        | 1.624        |
| 15                | 5                          | 3                  | 2                         | 1                          | 1  | 1                            | 2  | 1.61                        | 1.055        |
| 16                | 6(60)                      | 1                  | 2                         | 2                          | 1  | 2                            | 3  | 1.99                        | 1.423        |
| 17                | 6                          | 2                  | 3                         | 1                          | 3  | 3                            | 2  | 2.00                        | 1.876        |
| 18                | 6                          | 3                  | 1                         | 3                          | 2  | 1                            | 1  | 1.51                        | 1.630        |
| K <sub>1</sub>    | 4.26                       | 11.0               | 9.18                      | 10.3                       | 10.2   | 10.4                         | 10.3   |                             |              |
| K <sub>2</sub>    | 5.39                       | 10.8               | 10.2                      | 10.2                       | 10.8   | 10.2                         | 10.4   |                             |              |
| K <sub>3</sub>    | 5.62                       | 8.26               | 11.1                      | 10.1                       | 9.55   | 9.87                         | 9.80   |                             |              |
| K <sub>4</sub>    | 4.32                       |                    |                           |                            |  |                              |  |                             |              |
| K <sub>5</sub>    | 5.46                       |                    |                           |                            |  |                              |  |                             |              |
| K <sub>6</sub>    | 5.49                       |                    |                           |                            |  |                              |  |                             |              |
| 极差 R <sub>i</sub> | 1.36                       | 3.14               | 1.95                      | 0.16                       | 1.21   | 0.56                         | 0.53   |                             |              |

## 2.8 摇瓶发酵中菌浓吸光度及 HA 产量的变化

吸光度随时间的变化见图 1。从图 1 可以看到, 发酵开始后, OD<sub>660</sub> 在 8~24 h 菌体生长速率最大, 必须保证菌体对 C、N、O 的需要, 硫酸铵可以在发酵 8 h 时加入摇瓶, 葡萄糖初始质量浓度为 20 g/L, 8 h 后补加 20 g/L, 16 h 后补加 20 g/L。HA 随时间

的变化见图 2。从图 2 看到, 发酵 32 h 后 HA 产量最高, 之后有所下降, 这是因为透明质酸酶的降解作用<sup>[7]</sup>, 因此确定 32 h 为发酵终点。另外, 发酵 32 h 后 pH 不再降低, 说明菌体不再产酸。因此, 也可以将 pH 值不再下降的点确定为发酵终点。

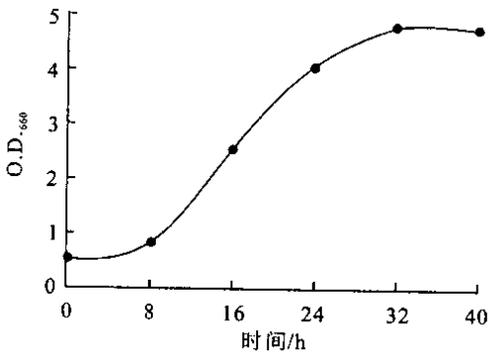


图 1 摇瓶发酵中菌浓吸光度变化曲线

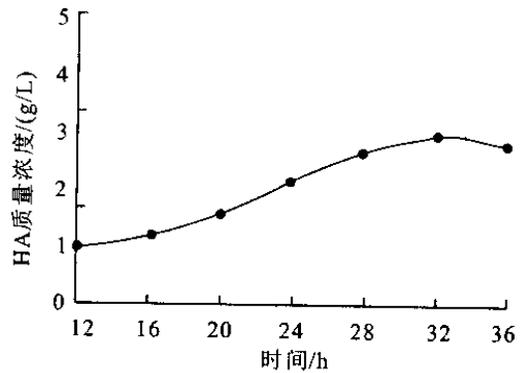
Fig. 1 Time course of OD<sub>660</sub> in the shaking-flask fermentation

图 2 摇瓶发酵中菌浓 HA 变化曲线

Fig. 2 Time course of HA concentration in the shaking-flask fermentation

## 参考资料：

- [ 1 ] Meyer K, Palmer J W. The polysaccharide of the vitreous humor[ J ]. *Biochem*, 1934, 107 : 629 - 634.
- [ 2 ] 郭学平, 凌沛学, 王春喜, 等. 透明质酸的生产[ J ]. *药物生物技术*, 2000, 7 : 61 - 64.
- [ 3 ] Laurent TC. Biochemistry of hyaluronan[ J ]. *Acta Otolaryngol (Stockh)*, 1987 (suppl), 442 : 7 - 24.
- [ 4 ] Sugahara K, Schwartz NB, Dorfman A. Biosynthesis of hyaluronic acid by streptococcus[ J ]. *Biochem*, 1979, 254 : 6252 - 6261.
- [ 5 ] 甘肃农业大学. 兽医微生物学[ M ]. 北京 : 中国农业出版社, 1989. 156 - 177.
- [ 6 ] 甘肃农业大学. 兽医微生物学实验指导[ M ]. 北京 : 中国农业出版社, 1980. 79 - 82.
- [ 7 ] Johns MR, Goh L-T, Oeggerli A. Effect of pH, agitation and aeration on hyaluronic acid produced by streptococcus zooepidemicus[ J ]. *Biotech*, 1994, 15(5) : 507 - 512.
- [ 8 ] 沈渤江, 张天民. 人脐带眼科用透明质酸的制备和分析检验[ J ]. *山东医学院学报*, 1985, 23 : 15 - 20.
- [ 9 ] 张铁茂. 试验设计与数据处理[ M ]. 北京 : 兵器工业出版社, 1990.

(责任编辑:李春丽)

(上接第 52 页)

- [ 2 ] 刘光明, 苏文金. 转基因产品的检测方法[ J ]. *集美大学学报(自然科学版)*, 2001, 6(1) : 87 - 92.
- [ 3 ] Dierk E R, Eva M W, Shin Y K, et al. Identification of unacceptable background caused by non-specific protein adsorption to the plates using a standardized ELISA[ J ]. *Enzyme-linked Methods*, 1999, 226 : 85 - 91.
- [ 4 ] 沈法富, 于元杰, 尹承侑. 利用 Dot-ELISA 检测 Bt 棉杀虫蛋白的研究[ J ]. *中国农业科学*, 1999, 32(1) : 15 - 19.
- [ 5 ] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南(第二版)[ M ]. 金冬雁, 黎孟枫译. 北京 : 科学出版社, 1995.

(责任编辑:杨萌)