

文章编号:1009-038X(2003)02-0014-04

# 高产、大分子透明质酸突变菌株 NUF-036 的选育

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:** 对兽疫链球菌 NUF-035 进行紫外诱变, 得到突变菌株 NUF-036, 使透明质酸的产量从 1.8 g/L 提高到 3.0 g/L, 相对分子质量从  $2.1 \times 10^6$  提高到  $3.2 \times 10^6$ , 突变株经多次传代, 透明质酸产量及相对分子质量保持稳定。

**关键词:** 兽疫链球菌; 透明质酸; 紫外诱变

**中图分类号:** Q 933

**文献标识码:** A

## Selection of Hyaluronic Acid Producing Mould Mutant Strain NUF-036

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 School of Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750004, China; 2. State Key laboratory of Bioreactor Engineering ECUST, Shanghai 200237, China)

**Abstract:** The original strain *Streptococcus zooepidemicus* NUF-035 was mutated by ultraviolet radiation. A mutant *Streptococcus zooepidemicus* NUF-036 was obtained. The yield of HA was increased from 1.8 g/L to 3.0 g/L and the HA molecular weight was increased from  $2.1 \times 10^6$  to  $3.2 \times 10^6$ . The mutant strain maintains perfect genetic stability after several generations of reproduction.

**Key words:** *Streptococcus zooepidemicus*; hyaluronic acid; UV mutation

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所占空间大 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, 使得透明质酸像“分子海绵”一样, 可以吸收与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>。

透明质酸具有保湿、营养、润肤等作用, 广泛用

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, 就像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, 而角质层的水分于皮肤健康的维持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, 可广泛应用于眼科、耳科、骨科和普外科等, 并已取得令人满意

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, 副教授, 生物化工硕士研究生.

的结果<sup>[3]</sup>。研究表明,产透明质酸的部位是链球菌的荚膜<sup>[4]</sup>。本实验以兽疫链球菌 NUF-035 为出发菌对其进行紫外诱变育种,获得高产、大分子透明质酸突变菌株,为工业化发酵生产 HA 打下基础。一般而言,医药用透明质酸的相对分子质量为  $1.0 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6$ <sup>[2]</sup>,由于在分离中 HA 分子质量大约损失 50%,实验要求突变菌株所产 HA 的相对分子质量至少达到  $3.0 \times 10^6$ ,才能分离到符合要求的 HA。

## 1 材料与方 法

### 1.1 出发菌株

*Streptococcus zooepidemicus* NUF-035,由本实验室保存。该菌株摇瓶发酵的粗品相对分子质量为  $2.1 \times 10^6$ ,产量为 1.88 g/L,作为紫外诱变出发菌株。

### 1.2 培养基

斜面培养基、种子液、发酵液组成见表 1。

表 1 培养基组成

Tab.1 Ingredient of cultural media

培养基成分	斜面培养基 质量浓度/ (g/L)	种子液 质量浓度/ (g/L)	发酵液 质量浓度/ (g/L)
Polypeptone	10	10	10
Yeast extract	15	15	10
NaCl	5.0	5.0	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O			0.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>			2.5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>			5.0
葡萄糖			60
琼脂	20		
pH 值	7.5	7.5	8.0

### 1.3 主要实验仪器及设备

721 型分光光度计:上海第三分析仪器厂制造;0.7 mm 乌式粘度计:上海第三分析仪器厂制造;SPX-150-Z 温控摇床:上海纤维仪器有限公司制造;SZX-2 超净工作台:上海纤维仪器有限公司制造;YXQ-SG41-280 电热手提压力蒸汽消毒器:上海塑新电子设备厂制造;暗室(内尺寸 60 cm × 60 cm × 30 cm,配 15W 紫外灯及磁力搅拌器),自制。

### 1.4 实验方法

1.4.1 悬浮液制备 将 *Streptococcus zooepidemicus* NUF-035 从甘油管中接入种子培养基进行培养。24 h 后,测定种子培养基的 OD<sub>600</sub> 值。15 mm × 150 mm 带棉塞的灭菌试管若干,每个试管内装有 4.5 mL 的灭菌生理盐水。另取一个灭菌的 150 mL

的三角瓶,瓶内装有灭菌玻璃小珠,玻璃珠数量以加入 15 mL 水后小球与液面齐平为宜。将种子液摇匀后吸取 15 mL 移入三角瓶内,振荡 20 min 以确保所得为单菌悬浮液。从瓶内吸取 0.5 mL 菌液至第一个试管内,即将种子液稀释 10 倍,稀释率为  $10^{-1}$ 。从第一个试管内吸取 0.5 mL 菌液至第二个试管内,即稀释  $10^2$  倍。依次类推,直至稀释倍数为  $10^7$ 。

1.4.2 照射方法 在每个内置小搅拌珠的 5 cm 平皿中注入 4 mL 悬浮液,置于距紫外灯 15 cm 处的磁力搅拌器,打开平皿计时照射,各平皿分别照射不同的时间。紫外灯在照射前预热 30 min,悬浮液照射后在暗室内放置 2 h 以上,以避免光复活对诱变的影响<sup>[5]</sup>。

1.4.3 菌株的摇瓶发酵 试管斜面 → 种子培养基 (35 ℃, 24 h) → 发酵培养基 (35 ℃, 300 r/min, 32 h)<sup>[6]</sup>。

1.4.4 测定方法 HA 产量测定、HA 相对分子质量测定见文献<sup>[3]</sup>;试剂盒定量检测微量毒素见文献<sup>[7]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 稀释倍数的确定

种子液稀释倍数在  $10 \sim 10^3$  时,平板菌落成密集状,无法计数;在  $10^4$  倍时菌落在 1 000 个左右,悬浮液中的细菌尚未成单细胞状态。为此,确定  $10^5$  为悬浮液稀释倍数。 $10^6$  倍数平板菌落较少,减少了出现高产突变株的概率。单菌悬浮液平板培养菌落计数见表 2。

表 2 单菌悬浮液平板培养菌落计数

Tab.2 Results of CFU

菌悬液 稀释倍数	不同平皿菌落数/个			平均值
	1	2	3	
$10^5$	168	149	97	149
$10^6$	23	14	9	12
$10^7$	0	0	1	0

### 2.2 致死率及诱变剂量的确定

将未照射 UV 的菌悬液与各时间梯度的悬液分别稀释后涂布平板,培养 48 h 后进行菌落计数,计算死亡率(见表 3)。

死亡率 = (未照射平板菌落数 - 照射平板菌落数) ÷ 未照射平板菌落数

为了得到较好的突变效果,选择致死率大于 90% 的照射剂量,即照射时间 60 s,照射距离 30 cm 作为诱变条件,对菌株进行诱变。

表3 致死率结果

Tab.3 Results of cell death rate

照射时间/s	菌落数/个	致死率/%
0	204	0
30	200	2
45	37	81.9
60	12	94.1
90	1	99.5
120	1	99.9

### 2.3 突变株分离

将稀释率  $10^{-5}$ 、距离 30 cm、时间 60 s 条件下照射的 10 个菌悬液平皿, 经过暗室放置 3 h 后, 在无菌条件下将其涂布于 9 cm 平板培养基上培养 48 h, 其菌落数见表 4。

将每个菌落用接种环在火焰无菌下接入试管斜面, 培养 48 h 后, 每个试管传 2 个试管斜面, 培养 48 h,  $0\sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存(保藏期为 1 周, 1 周后再传种)。

### 2.4 突变株筛选

对试管用 6 位数编号, 第 1、第 2 位数表示平皿号, 第 3、第 4 位数表示从平皿接入试管的顺序号, 第 5、第 6 位表示试管代号。

对所选 115 个照射菌株进行摇瓶实验。每个菌号 3 瓶, 实验重复 3 次, 其中有 76 个菌株在 3 次实验中当发酵 12 h 后  $\text{OD}_{660}$  值不再增加, 17 个菌株在

发酵 16 h 后  $\text{OD}_{660}$  值停止增加; pH 经过  $1\text{ mol/dm}^3$   $\text{NaHCO}_3$  调至 7.5~8.0 后不再下降, 只有 22 个菌株在 16 h 后  $\text{OD}_{660}$  值继续增加; pH 值在 24 h 降至 5.0~6.0, 调 pH 后发酵继续, 32 h 后 pH 不再变化, 发酵结束。实验结果见表 5。数据采用 3 组数据的平均值。

表4 照射平皿生长的菌落数

Tab.4 CFU in the plate after UV mutation

平皿号	菌落数/个
1	13
2	12
3	9
4	11
5	11
6	10
7	13
8	9
9	11
10	16
合计	115

表5 发酵实验结果

Tab.5 Fermentation experiment results

序号	菌号	$\text{OD}_{660}$ 值	产量/(g/L)	相对分子质量 ( $\times 10^6$ )	残糖质量 浓度/(g/L)	残氮质量 浓度/(g/L)	催化剂质量 浓度(mg/mL)
1	10701	4.231	0.984	1.26	23.21	2.330	0.472
2	11201	3.656	0.765	1.31	27.98	2.680	0.398
3	30601	4.156	0.871	1.09	26.43	1.570	0.321
4	41102	4.232	1.327	1.79	21.56	1.690	0.304
5	50102	4.001	1.272	1.70	23.27	1.820	0.412
6	50202	5.122	1.981	2.10	17.55	1.220	0.369
7	50702	4.322	1.783	1.97	16.53	1.570	0.497
8	60302	4.788	2.325	2.30	7.550	1.320	0.482
9	70103	5.322	3.241	3.20	4.230	1.270	0.467
10	70403	4.189	2.024	2.76	9.820	2.320	0.327
11	80203	4.636	1.987	1.80	12.32	2.980	0.441
12	80603	3.573	0.964	1.31	31.05	4.550	0.453
13	80703	4.681	2.121	1.46	19.83	2.330	0.475
14	80903	4.322	1.954	2.71	16.02	2.550	0.497
15	90204	5.613	2.782	3.10	7.650	1.110	0.364
16	90404	3.802	1.035	2.21	23.23	3.640	0.394
17	90504	5.798	2.811	3.36	10.01	2.010	0.447
18	91004	4.864	2.021	2.07	11.23	2.870	0.421

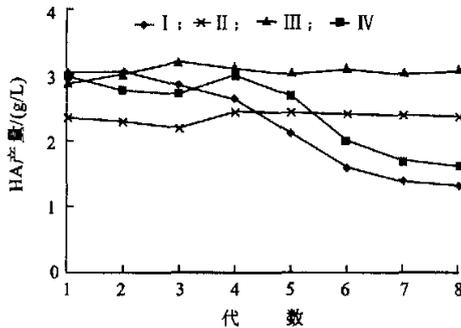
## 2.5 目标突变株选择

表5中相对分子质量大于  $2.60 \times 10^6$ 、产量高于  $2.0 \text{ g/L}$ 、内毒素低于  $0.50 \text{ mg/mL}$  的菌株列入表6,确定为目标突变株。

表6 目标突变株

Tab.6 The elected mutants					
序号	菌号	产量/ (g/L)	相对分子 质量 ( $\times 10^6$ )	尝试剂 质量浓度/ (mg/mL)	编号
9	70103	3.241	3.20	0.467	I
10	70403	2.024	2.76	0.327	II
15	90204	2.782	3.10	0.364	III
17	90504	2.811	3.36	0.447	IV

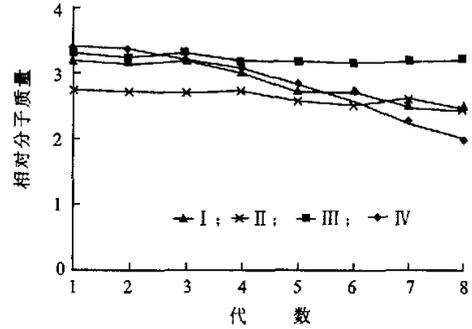
对以上4个菌株重复实验8次,用其每次传代的菌株,每次传代进行1次摇瓶实验,实验稳定性见图1和图2。



I. 70103号; II. 70403号; III. 90204号; IV. 90504号

图1 HA产量与菌株传代数的关系

Fig.1 Relationship between HA production and strain generation



I. 70103号; II. 70403号; III. 90204号; IV. 90504号

图2 HA相对分子质量与菌株传代数的关系

Fig.2 Relationship between HA molecular weight and strain generation

从图1和图2可以看出, III号菌系(90204的后代)产量为  $2.78 \sim 3.21 \text{ g/L}$  及相对分子质量为  $3.09 \times 10^6 \sim 3.26 \times 10^6$ , 均稳定, 其余3个菌系无此稳定性; IV号菌系虽然在起初产量、相对分子质量均高, 但传到第8代时产量已低于  $2.0 \text{ g/L}$ , 相对分子质量低于  $2.5 \times 10^6$ . 所以将 III号菌系的 90214 确定为目标菌种, 命名为 NUF-036 号菌株, 制成甘油管保存。

## 参考文献:

- [1] Meyer K, Palmer JW. 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 strptococcus[J]. *Biochem*, 1979, 254: 6252-6261.
- [5] 陶文沂. 工业微生物生理与遗传育种学[M]. 北京: 中国轻工出版社, 1997. 227-231.
- [6] Kim J-H, Yoo S, Oh D, et al. Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture conditions for the production of molecular weight hyaluronic acid[J]. *Enzyme and Microbial Technol*, 1996, 19: 440-445.
- [7] 焦炳华. 分子内毒素学[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1995. 315-328.

(责任编辑: 杨勇)