

文章编号 :1009-038X(2000)04-0315-04

大肠杆菌 ^{60}Co 诱变育种及其发酵 生产聚唾液酸条件

詹晓北, 郑志永, 贾薇, 朱莉
(无锡轻工大学生物工程学院, 江苏无锡 214036)

摘 要 对产聚唾液酸菌株大肠杆菌 WX-J11 进行 ^{60}Co 诱变, 筛选出高产突变株 WX-J4, 其聚唾液酸产量可达 1 001 mg/L, 通过优化发酵条件即在 250 mL 的摇瓶中, 250 r/min 转速下, 37 °C 恒温培养 65 h, 起始 pH 值为 7.8, 装液量为 40 mL, 使聚唾液酸的产量提高到 1 500 mg/L. 聚唾液酸在菌体生长停止后释放到培养基中, 动力学上表现为次级代谢产物. 此外, 还对聚唾液酸的提取、水解和唾液酸的纯化作了初步研究.

关键词 : 大肠杆菌 WX-J11 聚唾液酸 唾液酸 诱变育种 摇瓶发酵
中图分类号 : TQ464.1 **文献标识码** : A

The Breeding of *Escherichia coli* ^{60}Co Mutagensis Strains and the Conditions on the Production of Polysialic Acid

ZHAN Xiao-bei, ZHENG Zhi-yong, JIA Wei, ZHU Li
(School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract : The feasibility of ^{60}Co mutagenesis for increasing polysialic acid production was studied on *Escherichia coli* WX-J11 strain. A polysialic acid overproducing mutant (WX-J4) was obtained. The polysialic acid content of the mutant was 1 500 mg/L by optimizing the physical conditions, when the culture was incubated at 37 °C for 65 h in 250 mL shaking flasks at 250 r/min, pH 7.8 and operated volume 40 mL. The release of polysialic acid into the broth started when growth stopped, showing typical secondary metabolite in kinetics. The separation and hydrolysis of polysialic acid, purification of sialic acid were preliminarily studied.

Key words : *Escherichia coli* WX-J11 ; polysialic acid ; mutagenesis ; shaking flask culture

唾液酸 (Sialic acids) 是一族神经氨酸 (Neuraminic acid) 的衍生物^[1], 其主要形式是 N-乙酰神经氨酸和 N-羟乙酰神经氨酸. 唾液酸广泛存在于动物细胞表面的糖蛋白和糖脂的糖链末端^[2], 通常以 α -2,3 或 α -2,6 糖苷键与 N-乙酰半乳糖胺或半乳糖

相连. 它是糖缀合物结构和功能多样化的重要物质基础, 与细胞的粘连和识别密切相关. 同时, 唾液酸及其衍生物在医药领域也有重要的功能. 国外研究表明, 游离的唾液酸是有效的抗粘附药物, 借助其本身的受体作用可竞争性抑制流感病毒的感染、僧

帽水母(蚂蟥)毒素强大的溶血作用及恶性疟原虫入侵红细胞等.

聚唾液酸(Polysialic acid)是 N-乙酰神经氨酸以 α -2,8 和(或) α -2,9 键连接的同聚物. 1957 年 Barry 和 Goebel 首先在大肠杆菌 K-235 和 K1 中发现该聚合物^[3],后来人们相继在 *Neisseria meningitidis* B、*Salmonella toucra* O48、*Citrobacter freundii* O5 中发现聚唾液酸. 由于唾液酸在动物组织、禽蛋和牛奶中含量比较低,分离提纯复杂,收率较低,因此难以工业化生产. 本研究利用遗传育种的方法诱变分离得到高产聚唾液酸菌株,通过发酵条件的优化,使产聚唾液酸能力达 1 500 mg/L,为工业化生产提供了依据.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 大肠杆菌 WX-J11,作者所在实验室保藏^[4].

1.1.2 培养基

1) 种子培养基(g/L):NaCl 5,牛肉膏 5,蛋白胨 10,pH 7.2~7.4.

2) 发酵培养基(g/L):D-山梨醇 25,NH₄Cl 6,MgSO₄ 0.6,K₂HPO₄ 90 mmol/L,pH 7.8.

1.1.3 指示剂 含 0.1 g/dL 溴百里酚蓝的 20% (体积分数)乙醇溶液.

1.1.4 唾液酸标准品 Pfanstiehl Lab Inc 公司赠送.

1.2 方法

1.2.1 种子培养 接一环斜面种子于装有 50 mL 种子培养液的 250 mL 容积三角瓶中,置于摇床上振荡培养,转速 250 r/min,偏心距 23 mm,温度 37 ℃,培养 12 h.

1.2.2 摇瓶发酵 接种量 4%,250 mL 的三角瓶装液量为 40 mL,于摇床上振荡培养,转速为 250 r/min,偏心距 23 mm,温度 37 ℃.

1.2.3 出发菌株菌液的制备 参照文献[4].

1.2.4 ⁶⁰Co 辐射诱变

1) 诱变剂量选择:辐射剂量为 800 Gy,处理 40 min.

2) 中间培养 取 1 mL 处理后的菌液接种于 10 mL 营养肉汤培养基,37 ℃、230 r/min 培养 12 h.

3) 取 0.5 mL 处理后的菌液进行稀释分离,取 3 个合适的稀释度倾注营养琼脂培养基于平板上,37 ℃ 培养,进行计数.

4) 取经过中间培养的菌液进行稀释分离,取 3

个合适稀释度的菌液倾注于营养琼脂培养基平板上,另取 3 个合适稀释度的菌液倾注于有指示剂的固体发酵培养基中,37 ℃ 培养 72 h.

1.2.5 筛选方法 参照文献[4].

1.2.6 聚唾液酸的测定方法 间苯二酚显色法^[5].

1.2.7 负染色 样品→5 g/dL 的戊二醛固定→磷酸缓冲液漂洗→1 g/dL 的钨酸气体固定→磷酸缓冲液漂洗→2 g/dL 的磷钨酸负染色→电镜观察(放大 30 000 倍).

1.2.8 聚唾液酸的提取 发酵液于 3 000 r/min 离心 15 min,取上清液,加入 2 倍体积的热乙醇煮沸 30 min,离心收集沉淀物,用少量水洗涤沉淀物 2 次,合并上清液,再用 2 倍体积冷乙醇沉淀,得到聚唾液酸粗制品.

1.2.9 聚唾液酸的水解 用 3 mol/L 的 H₂SO₄ 将聚唾液酸溶液调至 pH 1.3~2.0,80 ℃ 水浴水解 60 min,得唾液酸单体.

1.2.10 唾液酸的纯化与纯度鉴定

1) 纯化 将水解后的产物,用饱和氢氧化钡溶液中和至 pH 5.6~6.0,离心去除沉淀物,上清液用制备型高压液相色谱分离(固定相为 μ Bondapak C18,流动相为体积分数 9% 的甲醇和体积分数 0.05% 的三氟醋酸,体积流量为 3 mL/min). 收集保留时间与标准品一致的色谱峰,旋转蒸发得到白色晶体.

2) 鉴定 红外光谱 KBr 压片法.紫外光谱 将纯化的唾液酸样品和标准样品按间苯二酚显色法^[5]处理,在 500~700 nm 吸收光谱处扫描.

2 结果与讨论

2.1 菌株的⁶⁰Co 辐射诱变

作者曾报导过用紫外线诱变 *E. coli* K-235 菌株,得到大肠杆菌 WX-J11,聚唾液酸的产量从 360 mg/L 提高到 660 mg/L. 但菌株的遗传性能不太稳定,有回复突变的可能,为进一步提高产聚唾液酸能力和菌株的稳定性,应采用不同的诱变方法,本研究采用电离辐射诱变——⁶⁰Co 诱变.

2.1.1 高产聚唾液酸诱变株的获得 经⁶⁰Co 诱变剂量测定试验,选定 800 Gy 的辐射剂量,处理 40 min,致死率为 99.2%. 再经初筛和复筛试验,从中选出一株高产聚唾液酸菌株,命名为 WX-J4,产酸量达 1 001 mg/L.

2.1.2 WX-J4 菌株的遗传稳定性试验 对 WX-J4 菌株进行连续 10 次传代试验,结果见表 1. WX-J4

菌株经 10 次传代后,聚唾液酸产量稳定在 998~1 156mg/L 之间,说明该菌株具有稳定的遗传性能.

表 1 大肠杆菌 WX-J4 的遗传稳定性试验
Tab.1 Genetic stability test of *E. coli* WX-J4

代数	<i>P</i> ₂	<i>P</i> ₄	<i>P</i> ₆	<i>P</i> ₈	<i>P</i> ₁₀
聚唾液酸产量/(mg/L)	1 001	998	1 123	1 156	1 013

2.2 聚唾液酸合成的动力学和不同物理参数对发酵的影响

大肠杆菌 WX-J4 的生长曲线和发酵曲线见图 1. 可以看出,菌体在生长 2 h 后进入对数生长期,约 15 h 后进入稳定期,68 h 左右进入衰亡期.从聚唾液酸的发酵曲线可看出,前 35 h 聚唾液酸的产量较低,35 h 后,菌体产酸量开始加速,65 h 左右菌体产酸量达到最高.由此可证明,聚唾液酸是大肠杆菌 WX-J4 的次级代谢产物.

作者所在实验室已有人研究了培养基化学成分对大肠杆菌 WX-J4 产聚唾液酸的影响,在此基础上作者研究了不同物理参数对产聚唾液酸的影响.

的三角瓶装液量为 40 mL,摇床转速为 250 r/min 时产酸量较大.

2.2.2 起始 pH 值对产酸量的影响 不同的起始 pH 值对产酸量的影响见图 3. 当 pH 为 7.8 时,产酸量最高. pH 值大小直接影响到胞内与聚唾液酸合成有关酶的活力,从而影响到聚唾液酸的合成. pH 过低会影响所合成聚唾液酸的聚合度,从而影响到聚唾液酸的产量^[3].

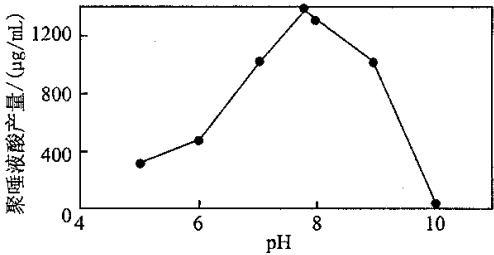


图 3 起始 pH 值对产酸量的影响

Fig.3 Effect of pH on polysialic acid production

2.2.3 温度的影响 Troy 和 Mccluskey 研究了温度对 *E. coli* K-235 产聚唾液酸的影响机理^[6]. 在温度低于 20 ℃ 时,分泌到发酵液中的聚唾液酸是很少的. 由图 4 可知,在 37 ℃ 时,聚唾液酸的产量最高,温度大于 40 ℃ 时,产酸量急剧下降.

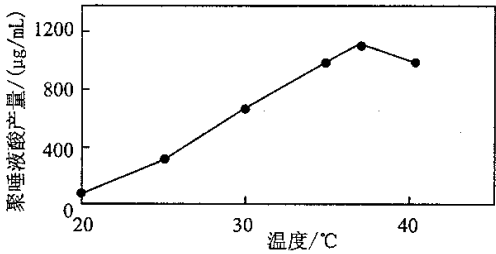


图 4 温度对产酸量的影响

Fig.4 Effect of temperature on polysialic acid production

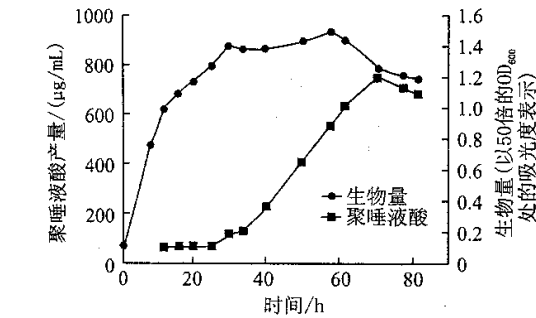


图 1 大肠杆菌 WX-34 的生长曲线和发酵曲线

Fig.1 Growth curve and fermentation curve of *E. coli* WX-J4

2.2.1 供氧条件对产酸的影响 供氧条件在多糖的生物合成中起着重要的作用,而摇瓶发酵过程的供氧主要取决于摇床转速和装液量. 不同装液量和摇床转速下的产聚唾液酸发酵试验结果见图 2. 可见,装液量和摇床转速对产酸影响较显著. 250 mL

2.3 诱变菌株不同生长时期的超微结构

采用负染色技术研究固体培养基中大肠杆菌 WX-J4 的微观形态特征,可以从透射电镜照片(见图 5)明显地看到该菌株的荚膜生长情况. 随着菌体生长时间的延长,荚膜不断地增厚(图中亮圈所示),菌体逐渐萎缩.

2.4 唾液酸的提取纯化和纯度鉴定

80 mL 发酵液,按本文所述方法处理,结果如表 2 所示. 经真空浓缩去除溶剂,得到纯化后的唾液酸 29 mg. 用间苯二酚显色法处理样品和标准品,它们的吸收光谱曲线是平行的(图 6). 由红外光谱(图 7)可看出,纯化后唾液酸的红外光谱与文献^[7]报道基本一致,这说明分离纯化所得的唾液酸已达到较高的纯度.

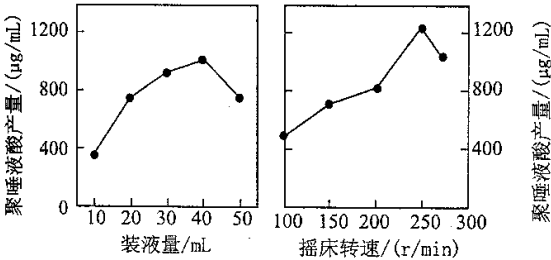


图 2 供氧条件对聚唾液酸产量的影响

Fig.2 Effect of volume and agitation on polysialic acid production

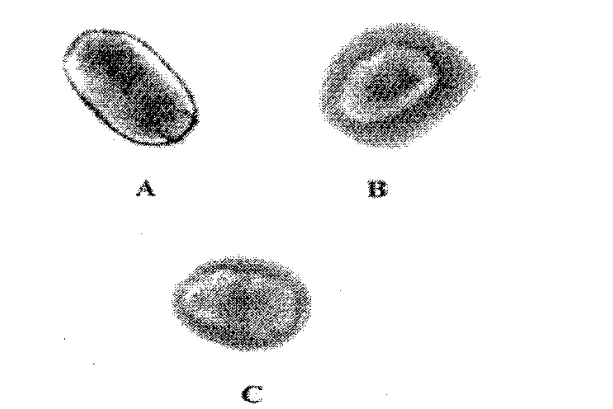


图 5 诱变菌株不同生长时期的超微结构

Fig.5 Microphotographs of *E. coli* WX-J4 grown in different periods

表 2 唾液酸的提取与纯化			
Tab.2 Separation and purification of sialic acid			
步骤	唾液酸质量 浓度/(mg/L)	体积/mL	收率/%
发酵液	1 044	80	100
热乙醇处理后洗涤	1 097	60	79
冷乙醇处理后再溶解	5 921	10	71
水解	3 506	15	63
制备型 HPLC 分离后	162	210	41

3 结 论

研究了不同物理参数对聚唾液酸合成的影响,通过对发酵培养条件的优化,该菌株产聚唾液酸能

力达到了 1 500 $\mu\text{g/mL}$.

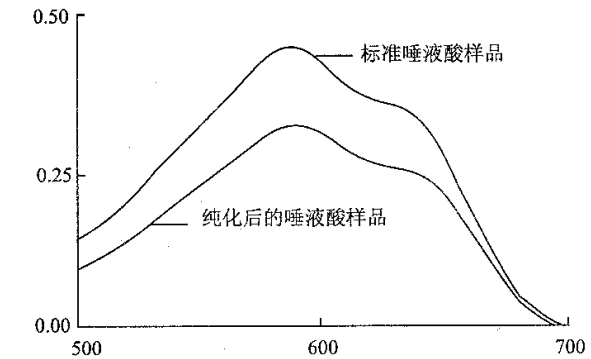


图 6 纯化后唾液酸的吸收光谱

Fig.6 Spectrum of purified sialic acid

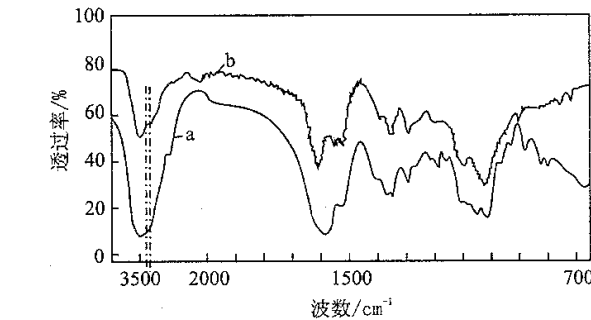


图 7 文献报道的唾液酸红外光谱 a 和纯化后的唾液酸的红外光谱 b

Fig.7 Infrared spectrum in literature and Infrared spectrum of purified sialic acid

参考文献

[1] G BLIX,A GOTTSCHALK,E KLENK. Proposed nomenclature in the field of neuraminic and sialic acids[J]. *Nature*,1957, 179 :1088.

[2] FEENEY R E,RHODES N B,ANDERSON J S. The distribution and role of sialic acid in chicken eggwhite[J]. *Journal Biology Chemistry*,1960,235(9) :2633~2637.

[3] BARRY G T,GOEBEL W F. Colominic acid, a substance of bacterial orgin related to sialic acid[J]. *Nature*,1957,179 :206.

[4] 贾薇,詹晓北,朱莉等. 高产聚唾液酸产生菌的诱变育种及培养条件确定[J]. *无锡轻工大学学报*,1999,18(6) :134~137.

[5] LARS SVENNERHOLM. Quantitative estimation of sialic acids [J]. *Biochemica ET Biophysica Acta*,1957,24(3) :604~611.

[6] TROY F A, MCCLOSKEY M A. Role of a membranous sialyltransferase complex in the synthesis of surface polymers containing polysialic acid in *Escherichia coli* [J]. *Journal Biology Chemistry*, 1979,254(15) :7377~7387.

[7] YOSHIHIRO UCHIDA, YOJI TSUKADA. Improved microbial production of colominic acid,a homopolymer of N-acetylneuraminic acid[J]. *Agriculture Biology Chemistry*, 1973,37(9) :2105~2110.

(责任编辑:李春丽)