

磁场条件下 Fe^{2+} 对产聚唾液酸大肠杆菌的诱变选育

吴金勇^{1,2}, 陈祥松^{2,3}, 袁丽霞², 朱薇薇², 孙立洁², 李俊³, 高兰兰², 姚建铭^{1,2,3}

(1.中国科学院大学,北京 100049;2.中国科学院 合肥物质科学研究院,
合肥 230031;3.淮南新能源研究中心,安徽 淮南 232001)

摘要:以产聚唾液酸(polysialic acid, PSA)的大肠杆菌(*Escherichia coli*)为出发菌株,在磁场条件下利用 Fe^{2+} 对该菌种进行多轮诱变选育,获得具有高产性能的诱变菌株,在 5 L 发酵罐进行发酵验证.结果表明:在 0.5 T 磁场条件下, Fe^{2+} 的最佳诱变质量浓度为 $90 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;经过 5 轮诱变和选育,PSA 的摇瓶发酵水平从 $1.09 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 提高到 $2.24 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;5 L 发酵罐发酵水平从 $4.79 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 提高到 $9.22 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,产量提高了 92%.

关键词:聚唾液酸;磁场;亚铁离子;诱变

中图分类号:Q939.9

文献标志码:A

聚唾液酸(polysialic acid)是 N-乙酰神经氨酸(N-Acetyl-D-neuraminic acid, NeuAc)以 α -2,8 和(或) α -2,9 键连接的同聚物^[1],是少数细菌的荚膜多糖的主要组分.1957 年,Barry 和 Goebel 首先在 *E.coli* K235 中发现聚唾液酸^[2],后来人们相继在大肠杆菌其他菌株中发现聚唾液酸,如 K1,K92 等.NeuAc 是细胞信息传递的第一接触位点^[3],且其分子结构具有多样性,因此 NeuAc 参与细胞识别、信号转导、肿瘤发生、受精等多个生理过程^[4-8].此外,NeuAc 能调节 IgG 的抗炎活性,增强婴幼儿免疫力,影响神经细胞的完整性、渗透性及活性,促进婴儿大脑的发育^[9-12].2016 年 2 月,美国 FDA 通过了丹麦 Glycom 公司提交的 N-乙酰神经氨酸 GRAS 评估;2017 年 6 月,欧盟食品安全委员会通过了丹麦 Glycom 公司提交的 N-乙酰神经氨酸 Novel Food 安全性评估;2017 年 5 月 31 日国家卫计委审核并批准了乳木果油等 10 种原料作为新食品原料使用,其中包含发酵来源的 N-乙酰神经氨酸.目前 NeuAc 逐步开始应用于食品、化妆品及医药领域,NeuAc 的来源越来越受到人们的关注.

目前,利用大肠杆菌发酵生产聚唾液酸的发酵水平较低,约为 $5 \sim 6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[13-14],发酵生产成本较高,限制了 NeuAc 的应用.本研究利用新型的菌种诱变技术对产 PSA 的大肠杆菌进行诱变改造,以提高菌种产 PSA 的水平,以期实现产业化.近年来,磁场对生物体的作用引起科研人员的关注^[15].2000 年,Zmyslony M 等发现,7 mT 磁场与 Fe^{2+} 共同作用会对小鼠淋巴细胞的 DNA 造成损伤^[16].2003 年,杨生玉等以 *Norcardia sp.* HD9611 作为出发菌株,研究双向联合磁场处理在诱变育种中的增变作用,发现联合诱变处理后的菌株比出发菌株酶活性提高了 37.9%,据此推测,磁场可能弥补单一诱变因子多次诱变产生的“热点”饱和,及 DNA 分子对某些因子的不亲和性,从而产生增变效应,提高突变率^[17].本实验室对磁场作用下的 Fe^{2+} 对菌种诱变的研究,并设计了一种自动磁场诱变机^[18].

本实验保藏有一株产聚唾液酸的菌株 PSA-W286,该菌是 *E.coli* K 235 通过紫外、化学诱变、离子束诱变等手段处理后获得,PSA 发酵水平相对于原始菌种有提高.本研究利用磁场和 Fe^{2+} 的共同作用进一步提高该菌种的产量水平,以期获得可以用于工业化的生产菌株.

收稿日期:2018-06-20;**修回日期:**2018-09-20.

基金项目:国家自然科学基金(215062351008217);淮南市重点研究和开发专项(2017A044);中科院等离子体物理研究所科学基金(DSJJ-16-YY02).

作者简介:吴金勇(1984-),男,安徽合肥人,中国科学院大学工程师,博士,研究方向为微生物发酵工程,E-mail:jywu@ipp.ac.cn.

通信作者:姚建铭(1963-),研究员,E-mail:jyyao@ipp.ac.cn.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

大肠杆菌 PSA-W286,本实验室诱变选育获得并保藏,PSA 的摇瓶发酵水平为 $1.09 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,5 L 发酵罐发酵水平为 $4.79 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.菌种以甘油管保藏于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,每1年传代一次.

1.1.2 主要仪器及试剂

台式离心机:Allegra X-30,BECKMAN;恒温恒湿摇床:ZWY-A211D,上海智城;超低温冰箱:Forma 900,Thermo Fisher;5 L 玻璃发酵罐系统:5 JG,上海保兴;紫外分光光度计:UV-1800,岛津;0.5 特斯拉(T)磁铁,市售,经中国科学院强磁场科学中心测定场强; FeCl_2 国药集团.

1.1.3 培养基

种子培养基($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$):蛋白胨 10,酵母浸膏粉 5,氯化钠 10,pH7.0.

摇瓶发酵培养基($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$):山梨醇 50,蛋白胨 6,酵母浸膏 2,三水磷酸氢二钾 20,七水硫酸镁 1,氯化铵 2,初始 pH7.5.

初筛培养基($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$):山梨醇 3,蛋白胨 6,酵母浸膏 2,三水磷酸氢二钾 20,七水硫酸镁 1,琼脂粉 20,1%溴百里酚蓝指示剂 2~3 滴,pH7.5.

发酵罐培养基($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$):山梨醇 30,蛋白胨 1,三水磷酸氢二钾 5,七水硫酸镁 1,氯化铵 6,pH6.4.

1.2 方法

1.2.1 菌悬液制备^[19-20]

将斜面培养 24 h 的菌种接种到装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,200 r/min,培养 12 h.取对数生长期的培养液 0.5 mL 接种到装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,200 r/min,培养 6 h.培养液在无菌条件下 10 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,用相同体积无菌生理盐水洗涤 2~3 次,制得到菌悬液.

1.2.2 磁场条件下的 Fe^{2+} 诱变

将磁场强度为 0.5 T 的磁铁放入空盒中固定,再将 24 孔板细胞培养板固定在磁场上,选择在磁铁正上方的孔,每孔加入 1 mL 待诱变的菌悬液(根据实验设计加入不同质量浓度的 FeCl_2 溶液).将整个装置固定在恒温培养摇床上,转速 50 r/min, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 3 h.

1.2.3 初筛

将 1.2.2 处理的菌悬液 10 000 r/min,离心 10 min,用无菌生理盐水洗涤 1 次.将洗涤后的菌悬液适当稀释,涂布初筛培养基, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后根据变色圈的大小筛选合适的菌株接种一级种子培养基.

1.2.4 复筛

从培养 24 h 的初筛菌种平板上,挑取单菌落,经过一级种子、二级种子培养,接种到装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,250 r/min,培养 72 h,检测发酵液中的聚唾液酸的含量.

1.2.5 聚唾液酸测定

间苯二酚-盐酸法^[21].

1.2.6 菌体干重测定

取 10 mL 发酵液,10 000 r/min 离心 5 min,去离子水洗 2 次,倒去清液, $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒重.

1.2.7 致死率测定

致死率 $= (A - B) / A$,其中 A = 诱变前活菌数($\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$)、 B = 诱变后活菌数($\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$).

1.2.8 正突变率

诱变后菌悬液适当稀释后,涂布于初筛平板,培养 24 h.测量初筛平板上菌落的变色圈直径大小,计算菌株正突变率,正突变率的计算公式如下:

正突变率 $= C / D$.

其中: C =不同 Fe^{2+} 质量浓度下变色圈直径比出发菌株大 10% 的菌落数; D =不同 Fe^{2+} 质量浓度下所挑取的总样本菌落数.

1.2.9 一级种子的培养

从培养 24 h 的初筛菌种平板上,挑取单菌落,接种到装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中,200 r/min,37 ℃ 培养过夜.

1.2.10 二级种子的培养

一级种子按 1% 的接种量接到装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中,200 r/min,37 ℃ 培养 6 h.

1.2.11 摇瓶发酵

二级种子按 5% 接种量接到装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中,250 r/min,37 ℃ 发酵 72 h.

1.2.12 发酵罐发酵

5 L 发酵罐装液量为 3 L,二级种子按 5% 接种量接种,发酵温度 37 ℃,初始通气量 1 vvm,初始转速 200 r/min,发酵后根据调整转速及通气维持 DO 高于 30%.发酵底料中加入 1 mL 泡敌抑制泡沫产生.发酵过程用氨水维持 pH6.4,底料碳源耗完后,以 $2.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 山梨醇补料至发酵结束,发酵时间 72 h.

2 结果和讨论

2.1 Fe^{2+} 质量浓度对大肠杆菌致死率的影响

将大肠杆菌 PSA-W286 放置于 0.5 T 磁场强度中,菌悬液中加入不同质量浓度 Fe^{2+} 诱变处理后,适当稀释分别涂布于初筛平板培养基上进行培养,每个质量浓度下随机挑选 10 块平板进行致死率统计.结果显示在 0.5 T 磁场强度下, Fe^{2+} 质量浓度与致死率有明显的剂量效应关系.随着 Fe^{2+} 质量浓度的提高,菌体的致死率也随着升高,当 Fe^{2+} 质量浓度为 $30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,大肠杆菌致死率为 69.3%; Fe^{2+} 质量浓度为 $120\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,大肠杆菌致死率为 97.4%; Fe^{2+} 质量浓度为 $180\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,大肠杆菌致死率为 99.2% (图 1).

2.2 Fe^{2+} 质量浓度对大肠杆菌产 PSA 正突变率的影响

将大肠杆菌 PSA-W286 放置于 0.5 T 磁场强度中,菌悬液中加入不同质量浓度 Fe^{2+} 诱变处理后,适当稀释分别涂布于初筛平板培养基上进行培养,每个质量浓度下随机挑选 10 块平板进行正突变率计数统计.结果显示,当 Fe^{2+} 质量浓度为 $90\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,正突变率为 12.5%;当 Fe^{2+} 质量浓度为 $180\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,正突变率为 2.3%.本研究选择 $90\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Fe^{2+} 质量浓度作为诱变浓度,致死率为 88.4% (图 2).

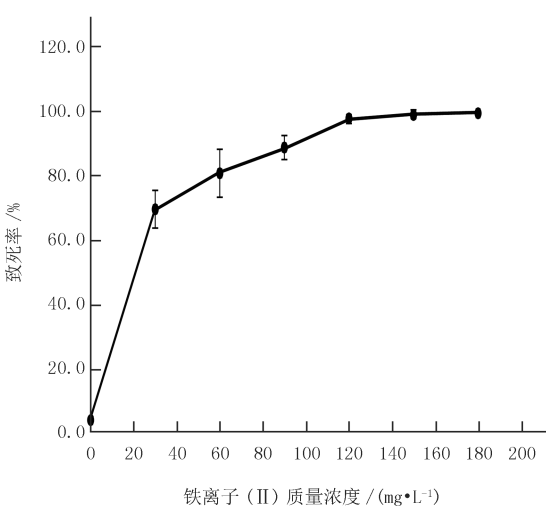


图1 Fe^{2+} 质量浓度对致死率影响

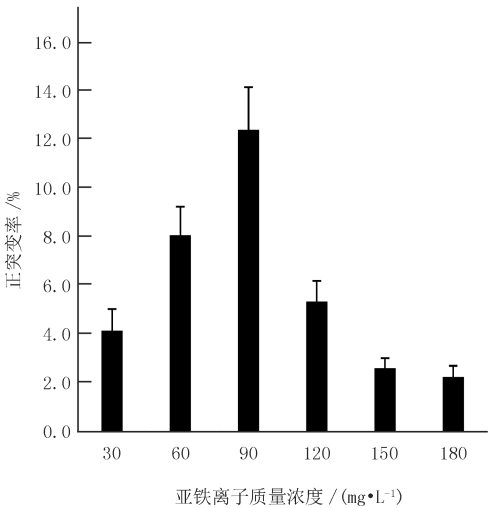


图2 Fe^{2+} 质量浓度对正突变率影响

2.3 高产菌株筛选

2.3.1 初 筛

挑取 2.2 实验中各平板变色圈最大的前 300 个单菌落,用于下一轮复筛实验.

2.3.2 第一轮复筛

将 2.3.1 中挑取的 300 个单菌落分别接一级种子、二级种子,然后进行摇瓶发酵培养 72 h,检测 PSA 产量.与出发菌种相比,产量提高 30% 以上有 1 株菌,提高 20%~30% 有 5 株菌,提高 10%~20% 有 72 株菌,PSA 产量下降的有 35 株菌;其中 90-42 号菌株 PSA 产量提高 34.1%,提高幅度最大,说明磁场与 Fe^{2+} 联合诱变效果显著(表 1).选取 PSA 产量最高的前 10 株菌进行第二轮复筛.

2.3.3 第二轮复筛

将 2.3.2 中挑取的 10 株菌分别接一级种、二级种子,再进行摇瓶培养 72 h,检测 PSA 产量,其中有三株菌产量提高 20% 以上(表 2),选取该三株菌进行遗传稳定性试验.

2.3.4 传代稳定性

经过初筛复筛获得的突变株 60-35、90-42、120-39,每传代 2 次进行摇瓶发酵实验,检测 PSA 产量,观察遗传稳定性.结果显示,该 3 株突变株遗传性能均较稳定(表 3).选择产量最高的 90-42 菌株作为下一轮诱变的出发菌株.

表 1 第一轮复筛 10 株高产菌的摇瓶发酵产量

菌株编号	PSA 单位产量/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	提高/%
CK	1.09	0.0
60-35	1.34	22.9
60-36	1.28	17.4
90-2	1.28	17.4
90-42	1.46	33.9
90-89	1.33	22.0
120-12	1.33	22.0
120-39	1.39	27.5
120-42	1.29	18.3
180-2	1.27	16.5
180-9	1.32	21.1

表 2 第二轮复筛 3 株高产菌发酵产量

菌株编号	PSA 单位产量/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	提高/%
CK	1.11 ± 0.06	0.0
60-35	1.36 ± 0.06	22.5
90-42	1.47 ± 0.07	32.4
120-39	1.41 ± 0.04	27.0

表 3 遗传稳定性结果($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

菌株编号	第 2 代	第 4 代	第 6 代	第 8 代	第 10 代
60-35	1.35	1.42	1.41	1.33	1.32
90-42	1.49	1.415	1.52	1.42	1.43
120-39	1.37	1.44	1.43	1.41	1.35

2.4 菌株的多轮诱变选育

以 90-42 菌株作为第二轮诱变出发菌株,0.5 T 磁场下 Fe^{2+} 质量浓度 $90 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,进行诱变、初筛(每轮初筛选取 300 株)、复筛、遗传稳定性验证,选择 PSA 摇瓶产量提高 10% 的菌株进行下一轮诱变出发菌株.经过 5 轮诱变后,得到菌种 5-45,PSA 产量达到 $2.24 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;第 4 轮开始,产量提高幅度降低(表 4).

表 4 五轮诱变选育结果

诱变轮数	菌株	PSA 单位产量/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	逐级提高比率/%
0	CK	1.09 ± 0.06	0.0
1	90-42	1.46 ± 0.08	33.9
2	2-34	1.61 ± 0.07	10.3
3	3-17	1.92 ± 0.16	19.3
4	4-19	2.14 ± 0.11	11.5
5	5-45	2.24 ± 0.18	4.7

2.5 发酵罐验证

将出发菌种 PSA-W286 及 5-45 两株菌分别接一级种子、二级种子,然后接种于 5 L 发酵罐进行发酵.接种量 5%,发酵温度 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$,初始通气量 1 vvm,初始转速 200 r/min ,发酵过程调整搅拌转速及通气量维持

DO 高于 30%。发酵底料中加入 1 mL 泡敌抑制泡沫产生。发酵过程用氨水维持 pH6.4,底料碳源耗完后,以 2.5 g · L⁻¹ · h⁻¹ 山梨醇补料至发酵结束,发酵时间 72 h。结果显示,PSA-W286 及 5-45 两菌株 5 L 罐发酵水平分别为 4.79 和 9.22 g · L⁻¹,生物量 OD600 分别为 118.7 和 130.3。PSA 产量提高幅度为 92%,明显高于生物量提高幅度,略低于摇瓶发酵水平 PSA 产量提高幅度。

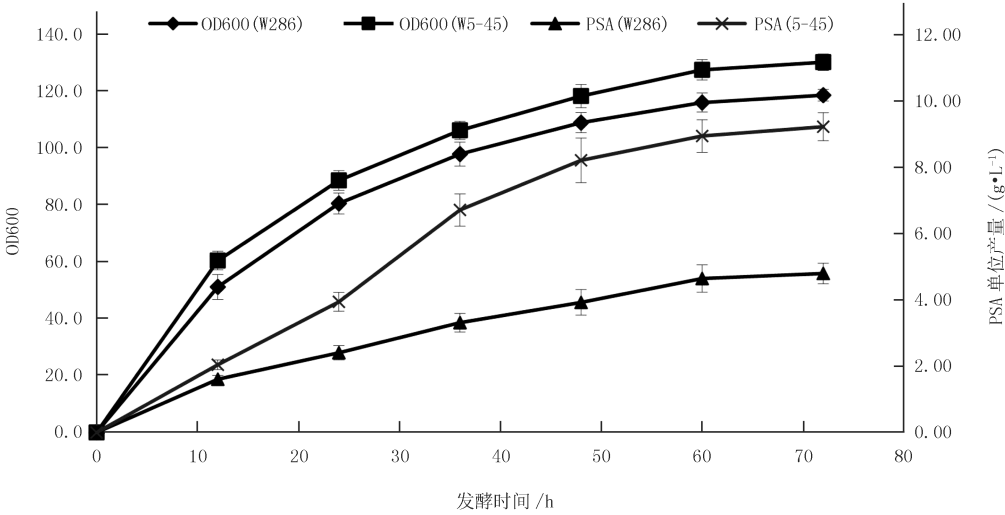


图3 W286 及 5-45 菌株 5 L 发酵罐发酵曲线

3 结 论

Fe²⁺在磁场条件下,对大肠杆菌具有明显的生物学效应。本研究在 0.5 T 磁场条件下,90 mg · L⁻¹ 的 Fe²⁺,对大肠杆菌 PSA-286 进行了 5 轮诱变和选育,菌种的摇瓶发酵水平和发酵罐发酵水平均有大幅度的提升,并且诱变菌种的遗传稳定性良好。5 L 发酵罐最终产量 9.22 g · L⁻¹,高于文献[13-14]报道的 5~6 g · L⁻¹水平。本研究为大肠杆菌高产 PSA 的选育提供了新的诱变思路,选育的高产菌株具有工业化生产的潜力,为发酵生产聚唾液酸的产业化提供了可供选择的途径。高产菌株的选育是企业的核心竞争力,是企业永恒的课题,后续需要对高产菌株 5-45 进行继续诱变选育。因为磁场能弥补单一诱变因子多次诱变产生的“热点”饱和,故可利用磁场诱变技术与离子束诱变育种等技术交替运用,提高突变率,选育出更高产 PSA 的菌株。

参 考 文 献

[1] Rodríguez-Aparicio L B, Reglero A, Ortiz A I, et al. Effect of physical and chemical conditions on the production of colominic acid by *Escherichia coli*, in a defined medium[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 1988, 27(5-6): 474-483.

[2] Barry G T, Goebel W F. Colominic acid, a substance of bacterial origin related to sialic acid[J]. Nature, 1957, 179(4552): 206-206.

[3] Reuter G, Gabius H J. Sialic acids structure-analysis-metabolism-occurrence- recognition.[J]. Biological chemistry Hoppe-Seyler, 1996, 377(6): 325-342.

[4] Schauer R, Fischer C, Lee H, et al. Sialic Acids as Regulators of Molecular and Cellular Interactions[M]. Lectins and Glycoconjugates in Oncology. Springer Berlin Heidelberg, 1988: 5-23.

[5] Schauer R. Achievements and challenges of sialic acid research[J]. Glycoconjugate Journal, 2000, 17(7/8/9): 485-499.

[6] Hu S, Chen J, Yang Z, et al. Coupled bioconversion for preparation of N-acetyl-d-neuraminic acid using immobilized N-acetyl-d-glucosamine-2- epimerase and N-acetyl-d-neuraminic acid lyase[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2010, 85(5): 1383-1391.

[7] Kelm S, Schauer R, Crocker P R. The Sialoadhesins-A family of sialic acid-dependent cellular recognition molecules within the immunoglobulin superfamily[J]. Glycoconjugate Journal, 1996, 13(6): 913-926.

[8] Kelm S, Schauer R. Sialic acids in molecular and cellular interactions.[J]. International Review of Cytology, 1997, 175: 137-240.

[9] Böhm S, Schwab I, Lux A, et al. The role of sialic acid as a modulator of the anti-inflammatory activity of IgG[J]. Seminars in Immunopa-

thology,2012,34(3):443-453.

[10] Saleem T.Soluble CD14,Sialic Acid and L-Fucose in Breast Milk and their Role in Increasing the Immunity of Breast-Fed Infants[J].A-merican Journal of Biochemistry & Biotechnology,2011,7(1):21-28.

[11] Wielgat P,Braszko J J.The participation of sialic acids in microglia-neuron interactions[J].Cellular Immunology,2012,273(1):17-22.

[12] Sprenger N,Julita M,Donnicola D,et al.Sialic acid feeding aged rats rejuvenates stimulated salivation and colon enteric neuron chemo- types.[J].Glycobiology,2009,19(12):1492-1502.

[13] Wu J R,Liu J L,Zhan X B,et al.Enhancement of polysialic acid yield by reducing initial phosphate and feeding ammonia water to *Esche- richia coli*,CCTCC M208088[J].Biotechnology & Bioprocess Engineering,2010,15(4):657-663.

[14] Zheng Z Y,Wang S Z,Li G S,et al.A new polysialic acid production process based on dual-stage pH control and fed-batch fermentation for higher yield and resulting high molecular weight product.[J].Applied Microbiology & Biotechnology,2013,97(6):2405-2412.

[15] Rosen A D.Mechanism of action of moderate-intensity static magnetic fields on biological systems.[J].Cell Biochemistry & Biophysics, 2003,39(2):163-173.

[16] Zmyslony M,Palus J,Jajte J,et al.DNA damage in rat lymphocytes treated in vitro with iron cations and exposed to 7 mT magnetic fields (static or 50 Hz)[J].Mutation research,2000,453(1):89-96.

[17] 杨生玉,卫军,刘宇鹏,等.双向联合磁场在诱变育种中增变作用的研究[J].微生物学通报,2003,30(5):82-86.

[18] 卢诗瑶,朱薇薇,孙立洁,等.一种自动磁场诱变机:中国,201510811874.X[P].2015-11-19

[19] 祁红兵,陈钧.PHB 高产菌株的选育[J].信阳师范学院学报(自然科学版),2007,20(1):48-51.

[20] 吴健,张少平,戴桂馥,等.庆大霉素高产菌株的抗性方法选育[J].信阳师范学院学报(自然科学版),2007,20(2):191-194.

[21] Svennerholm L.Quantitative estimation of sialic acid II[J].Biochimica Et Biophysica Acta,1957(24):604-611.

Title Screening of high-yield polysialic acid producing *Escherichia coli* mutants induced by magnetic field combined with Fe²⁺

Wu Jinyong^{1,2}, Chen Xiangsong^{2,3}, Yuan Lixia², Zhu Weiwei², Sun Lijie², Li Jun³, Gao Lanlan², Yao Jianming^{1,2,3}

(1.University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;2.Hefei institutes of Physical Science , Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China; 3.Huainan New Energy Research Center, Huainan, 232001, China)

Abstract:Compound mutagenesis using magnetic field and Fe²⁺ was carried out several rounds to gain a high-yielding *Escherichia coli* strain of polysialic acid (PSA) fermentation and the high-yielding strain was verified in 5 L fermentor. The re- sults showed that the optimal Fe²⁺ ion concentration was 90 mg · L⁻¹ in the compound mutagenesis using magnetic field of 0.5 T. The concentration of PSA in shaking flask fermentation in creased from 1.09 g · L⁻¹ to 2.24 g · L⁻¹ after five rounds of mutagenesis, while the concentration of PSA in 5L fermentor fermentation raised from 4.79 g · L⁻¹ to 9.22 g · L⁻¹, increased by 92%. Therefore, the compound mutagenesis of magnetic field and Fe²⁺ showed obvious effect on *Escherichia coli* of PSA fer- mentation.

Keywords: polysialic acid; magnetic field; Fe²⁺; compound mutagenesis

[责任编辑 王凤产]