

胆固醇氧化酶高产菌类芽胞杆菌的诱变选育

王发合, 杨辉, 朱萍, 梁海秋, 周河治

(广西大学生命科学与技术学院, 广西 南宁 530004)

摘要: 由本实验室产胆固醇氧化酶的菌株类芽胞杆菌作为出发菌株, 经过紫外+LiCl、紫外+光敏试剂(8-mop)物理化学诱变处理, 最后得到一株突变株 XUM-10, 并对其进行发酵条件的优化, 最终酶活为 221.20 U/L, 其酶活为出发菌株的 2.5 倍。

关键词: 类芽胞杆菌; 胆固醇氧化酶; 诱变选育

中图分类号: TS201.2⁺5; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)03-0007-04

Mutation and Breeding of *Paenibacillus* sp. with high Cholesterol Oxidase Activity

WANG Fa-he, YANG Hui, ZHU Ping, LIANG Hai-qiu, ZHOU He-zhi

(College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: The mutation strain was obtained from *Paenibacillus* sp. X534 of our lab, and was mutagenized with Ultraviolet+LiCl and Ultraviolet+8-mop, giving XUM-10 strain. The fermentation conditions of XUM-10 strain were also studied. Results showed that the enzyme activity was 221.20U/L, which was 2.5 times higher than parent strain.

Key words: *Paenibacillus* sp.; cholesterol oxidase; mutation and breeding

胆固醇是一种动物性甾醇, 是构成动物细胞膜的必需组分, 它对人体有一系列生理生化功能, 但近年来医学研究表明, 食品中高含量的胆固醇对人体健康有不良影响, 容易引起动脉粥样硬化、冠心病、脑中风等心血管疾病, 然而胆固醇被胆固醇氧化酶氧化的产物胆甾-4-烯-3-酮, 却能作为治疗心血管疾病和抗肥胖等的药剂^[1]。另外, 胆固醇氧化酶能够快速准确的检测血液中胆固醇的浓度, 生产低胆固醇的食品和激素类药物, 还可以作为工具酶在生物领域应用, 它还能作为杀虫剂杀死棉花的主要害虫棉铃象甲, 因此胆固醇氧化酶的开发就有重要的意义^[2-6]。

自然界中的微生物产的胆固醇氧化酶大多为胞内酶, 而且酶活较低, 这就制约了其生产和应用。本实验室以一株产胆固醇氧化酶类芽胞杆菌作为出发菌株, 经过紫外+LiCl、紫外+光敏试剂物理化学诱变处理, 最后得到一株产胞外酶的突变株 XUM10, 并对其进行发酵条件的优化, 最终酶活为 221.20U/L, 其酶活为出发菌株的 2.5 倍, 为进一步的研究打下了基础。

1 材料与amp;方法

收稿日期: 2006-11-17

作者简介: 王发合, 硕士, 研究方向为微生物工程

1.1 材料

1.1.1 菌株: 类芽胞杆菌 X534, 本实验室提供。

1.1.2 培养基

(1) 斜面培养基(%): 葡萄糖 2, 牛肉膏 1.5, 蛋白胨 1, NaCl 0.5, 琼脂 2。

(2) 种子培养基(%): 不加琼脂, 其它同斜面培养基。

(3) 发酵培养基(%): 土豆汁 20, 葡萄糖 1.5, 胆固醇 0.04, 吐温-80 0.1, NaCl 0.5, KH₂PO₄ 0.016, MgSO₄ · 7H₂O 0.02, MnSO₄ · H₂O 0.02, pH 7.0。

(4) 筛选培养基(%): 胆固醇 2.0, NH₄NO₃ 0.3, NaCl 0.5, KH₂PO₄ 0.016, MgSO₄ · 7H₂O 0.02, MnSO₄ · H₂O 0.02, 琼脂 2。

1.1.3 主要仪器与试剂

UV-1601 型紫外分光光度计: 日本 SHIMADZU 公司; HYG-IIa 迴转式恒温调速摇瓶柜: 上海欣蕊自动化设备有限公司; 电热恒温水浴锅: 上海器械工厂; 高速冷冻离心机 J2-21: Beckman 公司。

胆固醇: BR 上海生物试剂公司; 4-氨基安替比林: AR 华东师范大学化工厂; 辣根过氧化物酶: 北京拜尔迪生物公司; TritonX-100 Sigma; 其他试剂为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 粗酶液的制备: 将发酵 50 h 的发酵液, 7000 r/min 离心 20 min, 取上清液即为粗酶液。

1.2.2 酶活力的测定^[7]

0.826 $\mu\text{mol/L}$ 的胆固醇/异丙醇溶液 100 μL , TritonX-100 100 μL , 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.5) 1 ml, 3 mmol/L 的 4-氨基安替比林 1 mL, 18 mmol/L 苯酚 1 mL, 7000 U/L 过氧化物酶 200 μL , 将上述组分, 充分混合均匀, 混合液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 3 min 后加入粗酶液, 测定 OD₅₀₀ 吸光度。在上述条件下, 1 min 内催化 1 μmol 胆固醇氧化为胆甾-4-烯-3-酮所需要的酶量为 1 个酶活单位。

1.2.3 培养方法

种子液: 挑一环菌落接于种子培养基, 30 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min, 摇床培养 12 h。

发酵液: 在发酵培养基中接入 5% 种子液, 30 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min。

1.2.4 菌悬液的制备

取对数期的培养液 10 mL, 离心 (6000 r/min, 10 min) 收集菌体。将沉淀用 10 mL 灭菌的生理盐水洗涤离心 2 次。之后将菌体打散悬浮于生理盐水中, 调整菌体浓度为 10^8 个/mL。

1.2.5 紫外+LiCl 复合诱变

开启紫外灯预热 15 min, 使光波稳定, 调整紫外光管与培养皿的距离为 30 cm, 将 5 mL 的菌体悬浮液分别加入到 ϕ 50 mm 的培养皿中, 置于诱变箱中, 开启磁力搅拌器, 打开皿盖, 进行诱变处理。照射时间分别为 15 s、30 s、45 s、60 s、75 s、90 s, 将 UV 照射后的菌悬液涂布在含 0.3% 的 LiCl 的培养基中, 使菌株生长过程中进行诱变。

1.2.6 紫外+光敏试剂 (8-mop) 复合诱变

以紫外+LiCl 复合诱变后筛选到的菌株为光敏试剂诱变的出发菌株。按 10% 的体积量加浓度为 10% 的 8-mop 光敏试剂到摇瓶菌悬液中, 在 100 r/min 的摇床上黑暗培养 1 h, 然后分别吸取 5 mL 加入到 ϕ 50 mm 的平底平板中, 在预热好的黑光灯下分别照射 30 s、60 s、90 s、120 s、150 s、180 s、240 s, 然后分别取照射液进行稀释涂布到平板, 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养。

1.2.7 筛选方法^[8]

初筛: 在筛选平板上挑选菌落较大或是菌落形态与原菌形态不同或是有透明圈的菌株做为初筛菌株斜面保存。

复筛: 将经初筛选得的斜面菌株上摇瓶进行发酵, 以确定发酵产酶较高的诱变菌株。

2 结果与讨论

2.1 紫外+LiCl 复合诱变致死率曲线

紫外+LiCl 复合诱变致死率试验结果如图 1 所示。

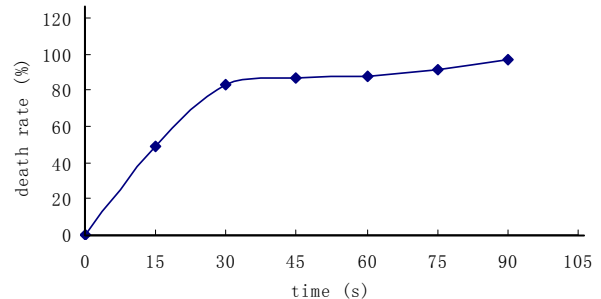


图 1 菌体 X534 紫外诱变剂量效应曲线

图 1 可看出, 在诱变时间达到 90 s 时, 菌体的致死率可达到 97%。由于菌株 X534 是原始菌, 并未经过多次诱变, 根据经验, 试验中应选取致死率较大的剂量, 故确定 90 s 为诱变剂量, 对 X534 菌株进行诱变。

2.2 紫外+LiCl 复合诱变试验结果

紫外+LiCl 复合诱变试验结果, 如表 1 所示。

表 1 紫外+LiCl 复合诱变试验结果

菌株号	XU7	XU8	XU12	XU13	XU14	XU35
酶活/(U/L)	131.75	128.76	130.54	117.64	135.13	111.40

突变菌株的酶活最高可以达到 135.13 U/L, 比出发菌株 X534 提高了 1.5 倍。

2.3 紫外+光敏试剂复合诱变致死率曲线

以菌株 XU14 为出发菌株, 采用紫外+光敏试剂复合诱变, 菌体的致死率曲线如图 2 所示。

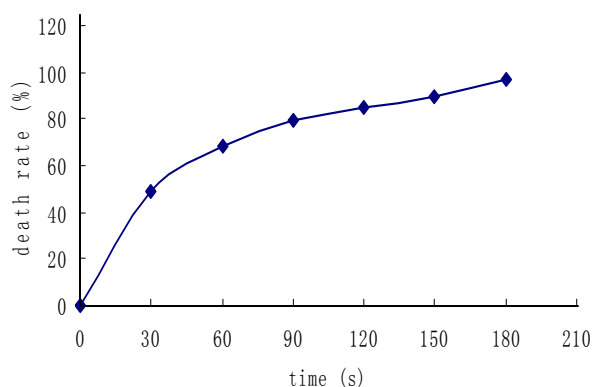


图 2 菌体 XU14 紫外+光敏试剂复合诱变致死率曲线

图 2 可看出, 在紫外+光敏试剂诱变时间达到 90 s 时, 菌体的致死率可以达到 79%。由于菌株 XU14 是经紫外线与 LiCl 复合诱变过的菌株, 根据经验, 试验中应选取致死率在 70%~80% 的诱变剂量或更低剂量诱变效果好, 故选取 90 s 为本试验的诱变剂量。

2.4 紫外+光敏试剂复合诱变结果

紫外+光敏试剂的复合诱变试验结果, 如表 2 所示。

表 2 紫外+光敏试剂的复合诱变试验结果 单位: U/L

菌株号	XUM5	XUM10	XUM11	XUM15	XUM33	XUM39
酶活	200.10	221.20	206.34	187.96	199.60	184.80

最终获得高产突变株 XUM-10, 酶活 221.20 U/L, 比出发菌株 XU14 的酶活提高 1.64 倍。

2.5 突变株 XUM10 产酶条件的研究

2.5.1 发酵温度对产酶的影响

不同的发酵温度对产酶量的影响试验结果, 如图 3 所示。

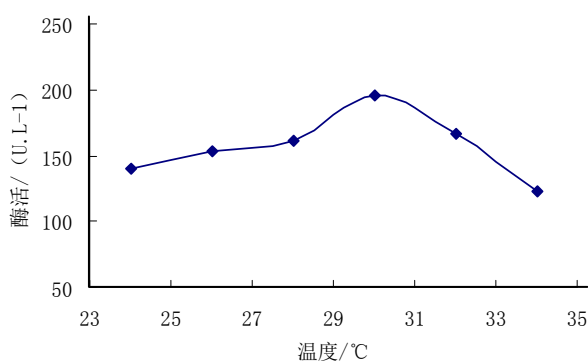


图 3 发酵温度对产酶的影响

从图 3 中看出, 当温度超过 30 °C 时, 产酶下降很快, 30 °C 时产酶最高, 因此, 诱变菌株 XUM10 产胆固醇氧化酶的最适温度为 30 °C。

2.5.2 pH 值对产酶的影响

不同 pH 值对发酵产酶量的影响如图 4 所示。

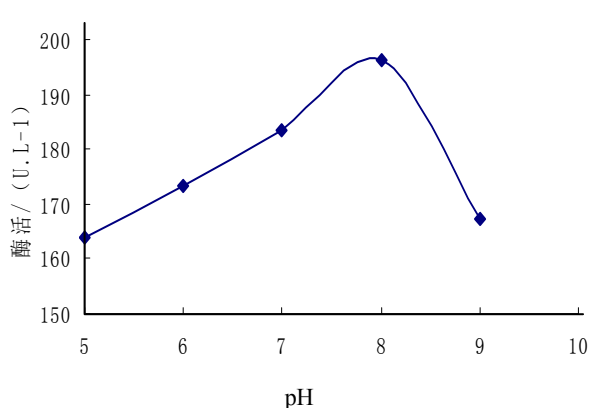


图 4 pH 值对产酶的影响

从图 4 可看出, 发酵培养基在中性偏碱的环境产酶最高, pH 8 时产酶量最高, 随后即急速下降, 因此, 产胆固醇氧化酶菌株 XUM10 的最适 pH 值为 8。

2.5.3 摇床转速对产酶影响

摇床转速对菌株 XUM10 产酶量影响的试验结果, 如图 5 所示。

从图 5 可看出, 随着摇床转速的增大, 酶活不断的增加, 当转速达到 200 r/min 以上酶活提高不大。这时溶解氧已经达到饱和, 再增加转速对产酶影响不大, 为了节能, 故应选转速 200 r/min。

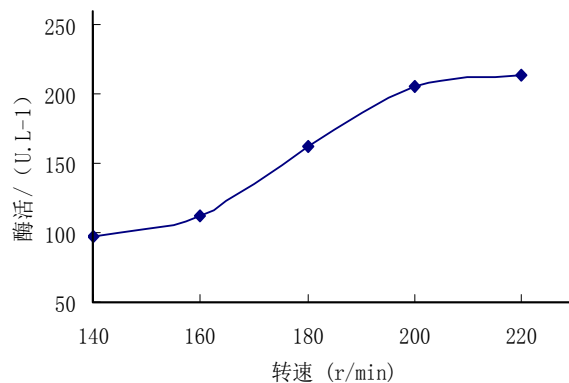


图 5 摇床转速对产酶

2.5.4 NH₄NO₃ 对产酶影响

氮源 NH₄NO₃ 的添加量对产酶量影响试验结果, 如图 6 所示。

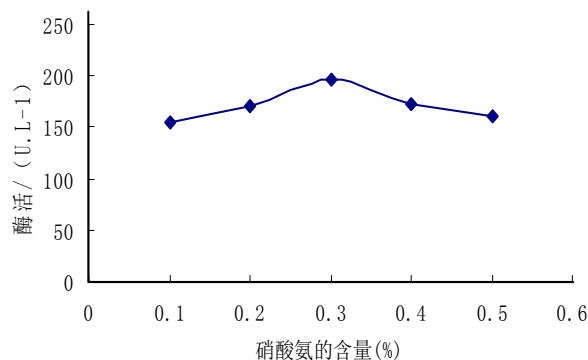


图 6 NH₄NO₃ 浓度对产酶影响

从图 6 可以看出, NH₄NO₃ 含量在 0.3% 时, 酶活达到最大值, 所以选 NH₄NO₃ 含量在 0.3%。

2.5.5 土豆汁含量对产酶的影响

土豆汁作为一种生长因子, 对产酶有较大影响, 单独考虑它的添加量对产酶的影响。

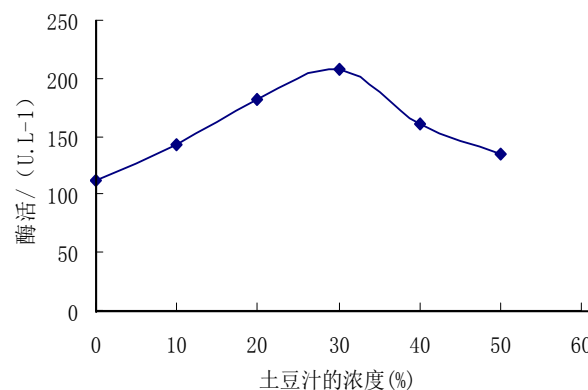


图 7 土豆汁浓度对产酶的影响

从图 7 可看出, 土豆汁的浓度对产酶影响很大, 当它为 30% 时, 酶活达到最高。

3 结论

(1) 通过紫外+LiCl、紫外+光敏试剂处理类芽孢杆菌 X534, 通过初筛和复筛, 筛选出一株酶活较高的诱变菌株 XUM10, 酶活为 221.20 U/L, 比出发菌株提高了近 2.5 倍。

(2) 通过对产酶条件的研究, 确定 XUM10 菌株最佳产酶条件为土豆汁 30%, 葡萄糖 1.5%, 胆固醇 0.04%, 吐温-80 0.1%, NaCl 0.5%, KH_2PO_4 0.016%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.02%, NH_4NO_3 0.3%, 温度 30 °C, Ph 8, 摇床转速 200 r/min, 培养 50 h。

参考文献

- [1] National Research Council, Diet and health implications for reducing chronic disease risk, National Academy Press Washington. DC.1989
- [2] Allain C Poon L S, Chan C S G, Richmond W Fu P C. Enzymatic Determination of Total Serum Cholesterol. Clin Chem, 1974, 20: 470-475

- [3] Somkuti G A, Solaiman D K&Steinberg D H. Native Promoter-plasmid vector system for heterologous cholesterol oxidase synthesis in Streptococcus thermophilus. Plasmid, 1995,33:7-14
- [4] Murooka Y, Choi K, Molnar I, Dziadek J, Cho H, Nomura N&Yamashita M. Recent Advances in Studies on Streptomyces Cholesterol Oxidase and Gene Clusters Involved in Steroid Catabolism in Prokaryotes. Actinomycetol, 1996, 10: 1--11
- [5] Stevens VL, XwT&Lambeth J D. Cholesterol pools in rat adrenal mitochondria: use of cholesterol oxidase to infer a complex pool structure. Endocrinology, 1992, 130:1557-1563
- [6] Ghoshroy KB, ZhuW &Sampson N S. Investigation of Membrane Disruption in the Reaction Catalyzed by Cholesterol Oxidase. Biochemistry, 1997, 36: 6133-6140
- [7] 季文明,陈毅力,等.比色法测定胆固醇氧化酶酶活.无锡轻工大学学报,2000,19(3):251-254
- [8] 赵芳,梁海秋,等.高活性胆固醇氧化酶产生菌出发菌株的筛选.现代食品科技,2006,(2):67-69

(上接第 6 页)

过 5.0 后, 随着 pH 值的上升, 酶活逐渐下降, 故选择酶解 pH 值为 5.0。

3 结论

3.1 土壤筛选出的 X_{y-1} 和 X_{y-5} 两株高产木聚糖酶菌株, 其最适培养基为 No.4 选择培养基 ($m_{\text{麸皮}}:m_{\text{木聚糖}}=1:1$), 酶活高达 398.7 U/mL 和 598.7 U/mL。

3.2 玉米芯用 10% NaOH 85 °C 下恒温浸提 4 h, 木聚糖的提取率最高, 为 14.142%。

3.3 木聚糖最佳的酶解条件为 pH 5.0、温度 50 °C、酶解时间 18 h, 此时木聚糖酶解产物分离效果最好。

4 讨论

实验中酶解底物为木聚糖醋酸钠-醋酸缓冲溶液, 由于木聚糖在醋酸钠-醋酸缓冲溶液中的溶解度较低, 整个体系以悬浮液的形式存在, 从而影响酶活的测定结果。为了减小影响, 实验中可在冰浴中用超声波细

胞破碎机进行处理, 可以提高木聚糖在醋酸钠-醋酸缓冲溶液里的溶解度。

参考文献

- [1] 赵国智,王锡忠,温纪发等.粮油食品科技,1998,(5):18-20.
- [2] Sanjeev K Sharma, Krishan L Kalra, Harmeet S Grewal. Enzymatic saccharification of pretreated sunflower stalks [J]. Biomass and Bioenergy, 2002, 23:237-243.
- [3] 李巧枝,董淑丽.生物化学实验技术[M].北京:气象出版社, 2002. 51-53.
- [4] 李彩霞,房桂干,刘书钗.木聚糖酶酶活的具体测定方法 [J].林产化工通讯, 2001, 35 (1): 20-23.
- [5] 杨瑞金,许时婴,王璋.中国食品添加剂[M].北京:中国轻工业出版社, 2000. 89-93.
- [6] 王律均,潘允红,徐祖建.糖品分析[M].北京:北京轻工业出版社, 2001.107-149.
- [7] 李丹.黑曲霉木聚糖酶的发酵、性质及其应用研究[D].东北师范大学硕士学位论文, 2004.5.