

文章编号: 1001-7453(1999)02-0018-05

胆固醇氧化酶发酵研究

韩振芳, 陈 亮, 王 武

(无锡轻工大学生物工程学院, 江苏无锡 214036)

摘要: 对从土壤中筛选到的菌株 DGC-007进行 UV 诱变, 选育到菌株 DGC-048. 对影响突变株产酶的条件进行了优化, 初步确定了 DGC-048 合适的产酶摇瓶培养基组成. 在发酵温度为 30℃, 培养基起始 pH7.5~8.0 的条件下, 接种量 10%, 发酵 48 h, 产酶可达 350 U/mol/(min·L).

关键词: 胆固醇氧化酶; 发酵; 胆甾-4烯-3酮

中图分类号: TQ925.9 **文献标识码:** A

胆固醇是一种动物性甾醇, 是构成动物细胞膜的必需组分. 就食品而言, 胆固醇普遍存在于动物性食品中. 胆固醇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^[1], 而胆固醇的氧化产物之一胆甾-4烯-3酮能作为治疗心血管疾病和抗肥胖等的药剂^[2,3], 因此开发一种专一性氧化胆固醇为胆甾-4烯-3酮的胆固醇氧化酶(COD)具有重要的意义.

1 材料与方法

1.1 菌种

短杆菌 DGC-048(本实验室保藏号).

1.2 培养基和培养方法

1.2.1 筛选平板培养基 酵母膏 0.05 g/dL, 碳源底物 0.1 g/dL, 硫酸 0.2 g/dL, 琼脂 2 g/dL; pH7.5.

1.2.2 斜面培养基 牛肉膏 0.3 g/dL, 蛋白胨 1 g/dL, NaCl 0.5 g/dL, 琼脂 2 g/dL; pH7.5.

1.2.3 种子培养基 牛肉膏 0.3 g/dL, 蛋白胨 1 g/dL, NaCl 0.5 g/dL; pH7.5.

1.2.4 摇瓶培养基 胆固醇 0.05 g/dL, 葡萄糖 2 g/dL, 酵母膏 0.75 g/dL, NaCl 0.1 g/dL, CH₃COONH₄ 0.2 g/dL, K₂HPO₄ 0.02 g/dL, MgSO₄ 5 mg/dL, FeSO₄ 1 mg/dL, CaCl₂ 0.01 g/dL, 表面活性剂 w 0.5 g/dL; pH7.5.

1.2.5 发酵培养方法 斜面→种子培养液→发酵液. 装液量都为 250 mL 的三角瓶装 30

收稿日期: 1998-09-21; 修订日期: 1999-03-10

基金项目: 国家轻工业局轻工科技发展计划项目(G03-13)

作者简介: 韩振芳(1972年9月生), 女, 湖北荆沙人, 工学硕士.

mL培养液, 30℃, 220 r/min, 种子液培养 12 h, 以 10% 接种量, 发酵培养 48 h.

1.3 实验方法

1.3.1 菌种筛选方法 土样经稀释后, 涂布于筛选平板培养基上, 于 30℃ 培养 4 d 后, 挑取有光圈的细菌进行摇瓶发酵培养. 取培养液加入等体积乙酸乙酯, 静置萃取过夜. 取上层萃取液点样, 在 G_{F254} 薄板上作薄层层析分析. 展开剂: $V(\text{三氯甲烷}) : V(\text{乙醚}) = 4 : 1$. 显色剂: 0.3% 的 2,4-二硝基苯肼与 30% 的浓硫酸-乙醇溶液.

1.3.2 紫外线诱变 取约 10^8 /mL 细胞浓度的菌悬液于 15 W 紫外灯 25 cm 处照射 50 s.

1.3.3 胆固醇氧化酶测定方法 1 个酶活力单位定义为, 在 37℃ 和 pH 7.5 的条件下, 每分钟氧化胆固醇产生 $1 \mu\text{mol}$ 胆甾-4 烯-3 酮所需的酶量.

测定方法: 取 0.2 mL 发酵液或上清液, 用含 0.03% 的 TritonX-100, pH 7.5, 0.1 mol/L 的磷酸钾缓冲液稀释 10 倍后测定, 37℃ 保温 3 min, 加入同温预热过的 1% 胆固醇-乙醇溶液 $100 \mu\text{L}$, 37℃ 振荡, 精确反应 15 min, 立即加入 1 mol/L 氢氧化钠-乙醇溶液和 5 mL 环己烷, 振荡 30 s, 静置萃取 2 h, 吸取 1 mL 上层萃取液于刻度试管中用无水乙醇定容至 5 mL, 在 241 nm 处进行紫外测定.

$$1 \text{ 酶活力单位 } (\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{L})) = (\text{O. D.}_E - \text{O. D.}_0) \div 0.03548 \times 125 \div 384 \div 15 \times 1000$$

O. D. _E —— 反应后紫外吸收值

O. D. ₀ —— 反应前紫外吸收值

0.03548 —— 胆甾-4 烯-3 酮紫外吸收标准曲线斜率

125 —— 稀释倍数

384 —— 胆甾-4 烯-3 酮相对分子质量

15 —— 反应时间 (min)

1000 —— 测算体积单位为升

2 结果与讨论

2.1 产胞外胆固醇氧化酶菌株的筛选

从土壤中筛选出 21 株在筛选平板培养基上呈现光圈的菌株, 将这些菌株接种发酵, 取其发酵液在 G_{F254} 薄板上作薄层层析分析. 从薄层层析结果得知, 其中有些菌株可产胞外胆固醇氧化酶, 将胆固醇专一性氧化为胆甾-4 烯-3 酮. 测定其发酵液酶活力可知, DGC-007 菌株的酶活力达 $60 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{L})$, 选取 DGC-007 作为进一步诱变的出发株.

2.2 紫外线诱变后高产胆固醇氧化酶菌株的选育

将经 UV 处理 50 s 的悬浮液涂布平板培养, 挑选光斑与菌落直径比大的菌落 40 个, 接种发酵, 取发酵液测定酶活力. 筛得菌株 DGC-048 产酶活力最高 ($100 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{L})$). 选取 DGC-048 作发酵研究.

2.3 碳源的选择

研究中选取了几种常见的碳源 (10 g/L), 替代摇瓶培养基 (未加胆固醇) 中的葡萄糖. 从表 1 所列的试验结果可见, 葡萄糖是产酶的最适碳源.

2.4 氮源的选择

用不同种类的氮源取代培养基 (未加胆固醇) 中的有机氮源和无机氮源, 添加量分别为:

有机氮源 0.5%,无机氮源 0.2% .表 2中所列结果说明 ,最好的有机氮源为酵母膏 ,无机氮源为 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$.

表 1 碳源对产酶的影响

碳源	酶活力 /($\mu\text{mol}/(\text{min}^\circ\text{L})$)
葡萄糖	104
麦芽糖	64
甘油	89
蔗糖	61
甘露醇	42
山梨醇	0
柠檬酸钠	38
不加碳源对照	51

表 2 氮源对产酶的影响

氮源	酶活力 /($\mu\text{mol}/(\text{min}^\circ\text{L})$)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	35.5
NH_4NO_3	23.3
NH_4Cl	25.7
$\text{CH}_3\text{COONH}_4$	86
NaNO_3	25.6
KNO_3	26.9
蛋白胨	62.4
酵母膏	87
不加氮源对照	0

2.5 胆固醇添加时间的确定

在胆固醇氧化酶发酵时加入诱导剂可提高产酶 ,且诱导剂添加时间对产酶也有一定的影响 .笔者对诱导剂添加的最适时间作了研究 .

胆固醇添加量为 0.05% ,结果见图 1.

图 1表明 ,胆固醇在接种时同时加入 ,酶产量有较大的提高 ,也可减少染菌机会 ;同时 ,胆固醇对菌株产酶也起到诱导作用 .

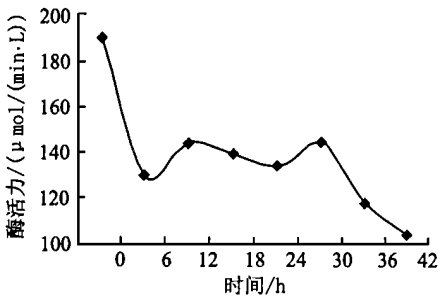


图 1 胆固醇添加时间对产酶的影响

2.6 表面活性剂对产酶的影响

表面活性剂及其它促进剂可通过改变细胞壁、细胞膜的通透性而促进胞外酶的分泌 .根据文献 [4,5],选择了表面活性剂 w 和表面活性剂 A 添加到发酵液培养基中进行产酶实验 .由于在培养过程中发现表面活性剂 A 强烈抑制菌体生长 ,故只研究了表面活性剂 w 对产酶的影响 .结果见表 3.

表 3 表面活性剂对产酶的影响

表面活性剂 w 添加量 %	相对总酶活力 / %	相对胞外酶活力 / %
0	100	48.1
0.05	104.8	52.9
0.1	114.2	60.9
0.2	128.5	71.2
0.5	153.8	77.6
1	63.9	66

从表 3可知 ,在不加表面活性剂 w 的情况下 ,菌株所产酶除一部分分泌到培养基中以外 ,还有相当一部分结合在细胞膜表面 .加入表面活性剂 w 对菌株产酶有很大促进作用 ,提高了菌株合成胆固醇氧化酶的能力及分泌到胞外的酶量 .关于表面活性剂 w 作为促进剂的机理还有待探讨 .

2.7 pH对产酶的影响

研究了发酵起始 pH对产酶的影响 ,起始 pH超出菌体生长的适宜 pH范围 ,将直接影响菌体生长繁殖和酶的合成 .研究的结果见图 2可见 ,起始 pH为 5.4时 ,菌体基本上不产酶 ;起始 pH为 6.0时 ,菌体产酶也较低 ;起始 pH在 6.5~ 8.5范围内 ,产酶得到提高 ,但最适起始 pH是 7.5~ 8.0.

粗酶液酶活力受反应体系 pH值的影响也得到研究 ,酶反应最适 pH为 7.5, pH低于 7或高于 8,酶活呈明显下降 .

2.8 通气量对产酶的影响

用改变摇瓶的装液量来调节控制通气量 .在 250 mL三角瓶中装入不同体积的发酵培

培养基,观察菌体产酶情况.结果见图 3.

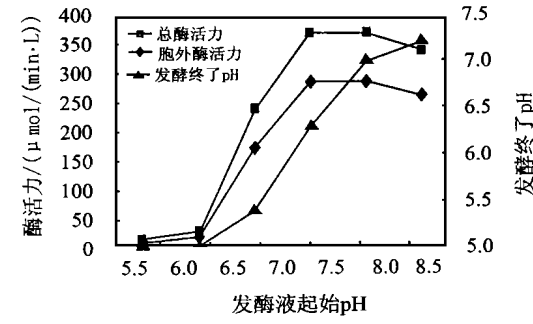


图 2 发酵液起始 pH对产酶的影响

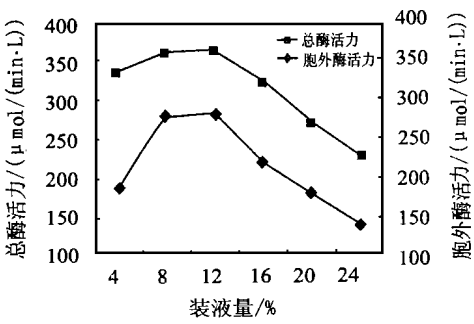


图 3 通气量对产酶的影响

图 3表明,摇瓶装液量以 10%左右为宜,装液量过大或过小,不仅影响酶的合成,而且也影响酶的渗透.

2.9 接种量对产酶的影响

以培养 13 h的发酵液为种子液,接入不同量的菌种,视察菌体产酶情况.结果见图 4.

图 4表明,接种量以 10%左右较为适宜.提高接种量,酶量未见增加.

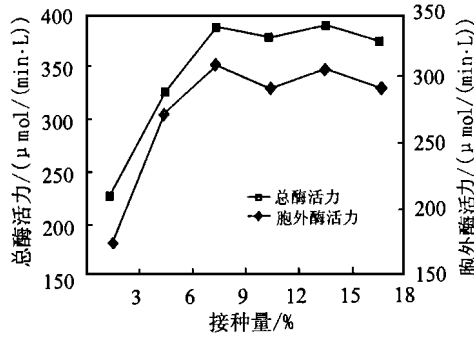


图 4 接种量对产酶的影响

2.10 培养温度对产酶的影响

分别考察了 25, 28, 30, 34, 37℃培养 48 h的情况,结果见图 5.

图 5表明,菌体培养温度在 34℃时,其产酶量、葡萄糖利用率都是最佳的,但此时分泌到胞外的酶活力下降,从酶提取方面考虑,该菌的培养温度在 28~ 30℃是较适宜的.

2.11 产酶时间的择定

在研究确定的最适条件下培养若干小时取样,分别测定其 pH,胞内、胞外酶活力,结果见图 6.

图 6表明,在培养到 48 h时,酶活力可达到最大值,然后随培养时间的延长,酶活力稍有下降,此时发酵液的 pH基本趋平.

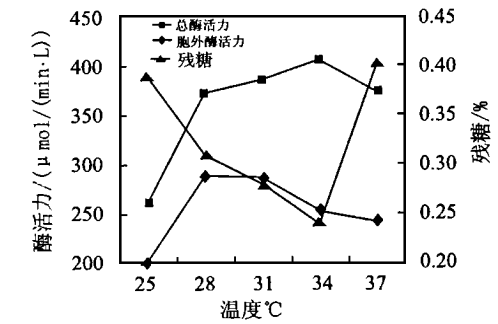


图 5 培养温度对产酶的影响

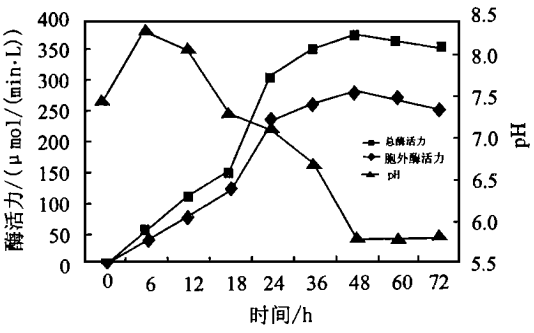


图 6 发酵曲线

3 结 论

研究了一种简易而有效的筛选产胆固醇氧化酶菌株的方法.利用这种方法筛得短杆菌产生株,所产的胆固醇氧化酶可部分分泌到胞外,能直接将胆固醇氧化生成胆甾-4烯-3酮,而后者具有治疗心血管疾病和抗肥胖等作用.经薄层层析方法检测,此酶在氧化胆固醇的过程中不产生其它胆甾类副产物.本研究初步探明了胆固醇氧化酶生成的各种条件,包括培养基主要成分、促进因子、底物添加时间、培养条件和产酶最适时间等,可供后续研究作为参考.

参考文献:

- [1] 刘应泉.油脂与健康[M].北京:人民卫生出版社,1989.
- [2] SUZU KE KUNIO. Formation of cholest-4-en-3-one by intestinal bacteria and its biological effect[J]. *Riken J Rev*, 1993, 3: 17~ 18
- [3] 朴惠顺,金松泽,方文龙.胆甾烯酮对小鼠体重和血清脂质的影响[J].延边医学院学报,1994, 17(1): 15~ 16
- [4] MICHAEL S. JAMES Z. DONALD P. Growth and cholesterol oxidation by mycobacterium species in tween 80 medium[J]. *Applied and Environmental Microbio*, 1993, 59: 1425~ 1429
- [5] 邬显章.酶制剂工业学[M].沈阳:辽宁出版社,1986.

Studies on the Cholesterol Oxidase Fermentation

HAN Zhen-fang, CHEN Liang, WANG Wu

(School of Bioengineering, Wuxi University of Light Industry, Jiangsu Wuxi 214036)

Abstract A extracellular cholesterol oxidase producing bacterium strain(DGC-007) was isolated from soil and mutated through UV light radiation. The mutant DGC-48 was obtained. The effects of fermentation conditions on cholesterol oxidase production were studied and opotimized. The enzyme yield of 350U/L was obtained when the mutant was cultured under the following conditions: temperature, 30℃; initial pH 7.5~ 8; inoculum size, 10%; fermentation period, 48 h.

Key words cholesterol oxidase; fermentation; cholest-4-en-3-one