

转氨酶产生菌的筛选鉴定及其摇瓶 发酵条件的优化

王 晶 李江华* 房 峻 陆 健 堵国成 陈 坚

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214122)

摘 要: 从土壤中分离到 1 株具有支链氨基酸转氨酶活性, 且亮氨酸转氨酶活性较高的菌株 WJ44。通过观察形态特征、生理生化实验以及 16S rRNA 序列的比对和系统发育分析, 鉴定其为蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)。经过对产酶条件的优化, 确定最佳摇瓶产酶条件为: 葡萄糖 20 g/L, 蛋白胨 15 g/L, 牛肉膏 5 g/L, 玉米浆 15 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, 初始 pH 7.0, 培养温度 37℃, 装液量 20 mL/250 mL 三角瓶, 摇床转速 200 r/min。WJ44 菌株在最佳产酶条件下培养 10 h 其亮氨酸转氨酶酶活即可达到 45.787 U/mL, 菌体干重 8.643 g/L, 分别比原来提高了 54% 与 10%, 是一株产酶和生长性能较佳的菌株。

关键词: 支链氨基酸转氨酶, 蜡状芽孢杆菌, 发酵条件优化

Screening, Identification and Fermentation Optimization of Aminotransferase-producing Strain

WANG Jing LI Jiang-Hua* FANG Jun LU Jian DU Guo-Cheng CHEN Jian

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122)

Abstract: A strain named as WJ44 with capability of producing branched-chain aminotransferase was isolated from the soil, the enzyme activity is especially high when used leucine as a substrate. According to the physiological characteristics, biochemical characteristics and 16S rRNA sequence of WJ44, the strain was identified as *Bacillus cereus*. The optimal carbon source and nitrogen source were also determined as 20 g/L glucose, 15 g/L tryptone and 5 g/L beef extract, respectively. The optimal proportion of other component in the medium is corn steep liquor 15 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L. The optimum original pH value is 7.0, the cultural temperature is 37℃, liquid volume is 20 mL/250 mL, the shaker's rotating speed is 200 r/min. The highest leucine transferase activity of 45.787 U/mL was achieved after 10 h under the optimal condition, and the dry weight of cell is 8.643 g/L, increased by 54% and 10% respectively. This result shows that WJ44 is a branched-chain aminotransferase-production strain with fine capability.

Keywords: Branched-chain aminotransferase, *Bacillus cereus*, Optimization

支链氨基酸转氨酶(Branched-chain Aminotransferase, BCAT, E.C.2.6.1.42)能够特异地催化包括亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸在内的疏水性氨基酸的 α -氨基基团转移到 α -酮酸,从而形成相应的支链 α -酮酸和氨基酸^[1]。目前,支链氨基酸转氨酶主要用于手性氨基酸对映体的拆分^[2]与 α -酮酸的合成^[3]。支链氨基酸转氨酶在动物^[4]、植物^[5]和微生物^[6,7]中分布很广,在迄今为止发现的至少50种转氨酶中,BCAT属于以磷酸吡哆醛作为辅酶的IV类转氨酶,它在生物体内芳香族氨基酸与支链氨基酸的分解与合成途径中扮演着重要的角色^[8]。

目前,对于微生物支链氨基酸转氨酶的研究主要集中于对大肠杆菌BCAT的反应机理、酶学性质、酶的结构等方面的深入研究^[9-11]。关于其他BCAT产酶菌的报道很少,如Søren等^[6]从发酵香肠中发现的肉葡萄球菌(*Staphylococcus carnosus*),Mireille等^[8]从奶酪中分离的乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)。相对于先前的研究,本实验不仅首次筛选出具有BCAT活性的蜡状芽孢杆菌,而且对其摇瓶培养条件也进行了初步优化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土样:从居民区公厕附近采集的土壤样品。

1.1.2 培养基:平板筛选培养基(g/L):蛋白胨10,牛肉膏5,酵母膏5,丙酮酸5,NaCl5,琼脂20,pH7.2。斜面保存培养基:营养琼脂培养基。种子培养基(g/L):葡萄糖20,蛋白胨10,玉米浆25,KH₂PO₄1,MgSO₄·7H₂O0.5,pH7.2。发酵培养基:同种子培养基。

1.1.3 转氨反应底物溶液:丙酮酸0.1 mol/L,氨基酸0.1 mol/L,5'-磷酸吡哆醛0.1 mmol/L,MgSO₄·7H₂O1 mmol/L,10%氨水调节pH8.5。

1.1.4 主要试剂:氨基酸由无锡晶海氨基酸有限公司提供, α -酮基亮氨酸钙购自南京化学试剂有限公司,5'-磷酸吡哆醛由Sigma公司进口分装。

1.2 测定方法

1.2.1 丙氨酸:纸层析法^[12]。

1.2.2 丙酮酸:紫外分光光度法^[13]。

1.2.3 α -酮酸:HPLC法:分离柱为20RBAX SB-C18柱(4.6 mm×250 mm,5 μ m)。流动相为90%(NH₄)₂HPO₄溶液(0.01 mol/L)和10%甲醇,用

1 mol/L 磷酸溶液调至pH2.7。进样量20 μ L,流速1 mL/min,紫外检测波长为210 nm。

1.2.4 酶活力的测定:5 mL底物溶液加入5 mL发酵液,0.5 mL 2%的十六烷基三甲基溴化铵溶液,37 $^{\circ}$ C振荡反应1 h,0.5 mL 10%三氯乙酸终止反应。根据丙酮酸的减少量来计算转氨酶的酶活。在本实验条件下,每小时内转化1 μ mol丙酮酸所需的酶量定义为1个酶活力单位U。

1.2.5 菌体干重的测定:取不同时间的10 mL发酵液离心,菌体用去离子水离心洗涤2次后65 $^{\circ}$ C烘干至恒重后称量,同时取相同发酵液稀释后以初始培养基作为空白,测定其在波长600 nm处的吸光值OD₆₀₀。分别以菌体干重和OD₆₀₀为横坐标与纵坐标,作出菌体干重-OD₆₀₀标准曲线,得回归方程为: $y = 2.7811x + 0.3663$,相关系数 $R^2 = 0.991$ 。

1.3 支链氨基酸转氨酶产生菌的筛选

参照潘光亮等^[14]的方法。土样稀释液(加10%酚液数滴抑制霉菌)涂布筛选平板,37 $^{\circ}$ C培养24 h后挑出较大菌落转接斜面,进行液体培养,取10 mL发酵液离心得到菌体,加入5 mL底物溶液振荡摇匀后37 $^{\circ}$ C水浴摇床反应6 h,取样测定丙氨酸。选择转化液中丙氨酸含量较高的菌株进一步验证转化液中的 α -酮基亮氨酸,两种转化产物都存在的菌株进行复筛,选择酶活较高的菌株作为出发菌株。

1.4 产酶菌株的鉴定

1.4.1 形态特征观察:营养琼脂平板上划线培养24 h观察菌落形态。革兰氏染色与芽孢染色按文献[15]所述方法。Quanta 200环境扫描电子显微镜观察细胞形态。

1.4.2 生理生化特征测定:按照常规方法^[15]。

1.4.3 DNA的提取和16S rRNA的PCR扩增及序列的测定:产酶菌DNA的提取方法参照文献[16]。PCR扩增引物为细菌16S rRNA通用引物,引物序列为:正向引物27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';反向引物1492R:5'-TACCTTGTTACGACTT-3'。PCR扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 4 min;94 $^{\circ}$ C 50 s,60 $^{\circ}$ C 90 s,72 $^{\circ}$ C 60 s,25个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。反应体系为:超纯水36 μ L,Taq酶Buffer5 μ L,2.5 mol/L dNTPs 5 μ L,引物各1 μ L,Taq酶1 μ L。产物用1%琼脂糖凝胶电泳,EB染色后紫外分析仪检测,DNA纯化试剂盒回收PCR产物。PCR产物测序由江南大学生物工程学院完成。

1.4.4 序列的分析和系统发育树的构建: 所测序列进入 GenBank 数据库进行同源性比对。从 GenBank 获得芽孢杆菌属相关菌株的 16S rRNA 基因序列, 以 Clustal X 软件^[17]进行多序列完全比对后, 用 MEGA3.1 的 Neighbor-Joining 法构建系统发育树^[18]。

1.5 培养方法

斜面种子活化后接入种子培养基于 37 °C 培养 14 h~16 h, 按 3%接种量接入发酵培养基培养 10 h。装液量 25 mL/250 mL, 摇床转速 200 r/min。

1.6 产酶条件的优化

分别考察培养基成份(碳氮源、玉米浆、无机盐)和培养条件(初始 pH 值、装液量、摇床转速、温度)对酶活力及菌体生长的影响, 以亮氨酸转氨酶酶活和菌体干重为检测指标, 实验结果均为 3 次平行实验的平均值。

2 结果与讨论

2.1 支链氨基酸转氨酶产生菌的筛选

由筛选平板分离到 274 株菌落较大的菌株, 验证转化产物后得到 14 株进入复筛, 选出 1 株亮氨酸转氨酶活性相对较高的菌株 WJ44, 它对不同支链氨基酸的底物选择性如表 1 所示。

2.2 产酶菌株 WJ44 的鉴定

2.2.1 WJ44 的形态特征: 营养琼脂培养基平板上, 37 °C 培养 24 h 可形成圆形或近似圆形, 质地较软且呈蜡烛样的白色菌落, 直径 5 mm~8 mm。革兰氏阳性, 杆状菌体单个分散或 3~5 个成链排列, 芽孢中

生。电子显微镜下观察杆状细胞长为 2 μm~3 μm, 宽为 0.8 μm~1.0 μm。

表 1 WJ44 菌株的底物选择性 Table 1 Substrate selectivity of WJ44	
支链氨基酸 Branched-chain amino acid	酶活 Enzyme activity (U/mL)
L-Leucine	29.703±0.621
L-Isoleucine	12.127±0.532
L-Valine	10.950±0.517

2.2.2 生理生化特征: WJ44 的生理生化特征见表 2, 菌株的生长温度范围为 15 °C~50 °C, 最适温度为 34 °C~45 °C, 生长的 pH 范围为 5.5~11.0, 最适 pH 为 6.5~7.5, 含盐 7%以下的培养基上能生长。

2.2.3 DNA 的提取和 16S rRNA 的 PCR 扩增及序列的测定: 提取的 DNA 片段大于 25 kb, 稀释 50~100 倍后通过 PCR 扩增出约 1100 bp 的 16S rRNA 片段, 纯化后由江南大学生物工程学院进行测序。

2.2.4 序列的分析及系统发育树的构建: 将 WJ44 菌株的 16S rRNA 序列(GenBank 登录序列号: EU409110)和 GenBank 数据库中的 16S rRNA 序列进行同源性比对, 选择相关性较高的菌株和芽孢杆菌属内相关菌株的 16S rRNA 序列进行比对分析并构建系统发育树(图 1)。结果表明 WJ44 在系统发育树上与芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)聚为一簇, 与 *Bacillus cereus* 同源性大于 99%。WJ44 的形态特征与 *Bacillus cereus* 极为相似, 生理生化鉴定结果仅有很小的差异^[19], 由此判定 WJ44 为一株蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)。

表 2 WJ44 的生理生化特性 Table 2 The physiological and biochemical characteristics of WJ44			
Characteristics	WJ44	Characteristics	WJ44
Lactose	+	Rhamnose	-
Fructose	-	Dextrin	-
Xylose	+	Glucose produced acid	+
Galactose	-	V-P	+
Sorbitol	-	Contact enzyme	+
Sorbose	-	Utilization of citrate solution	+
Tyrosine hydrolysis	+	Denitrification	+
Sucrose	+	Gelatin hydrolysis	+
Maltose	+	Amylohydrolysis	+
Arabinose	-	MR	+

+: 阳性反应; -: 阴性反应
+: Positive reaction; -: Negative reaction

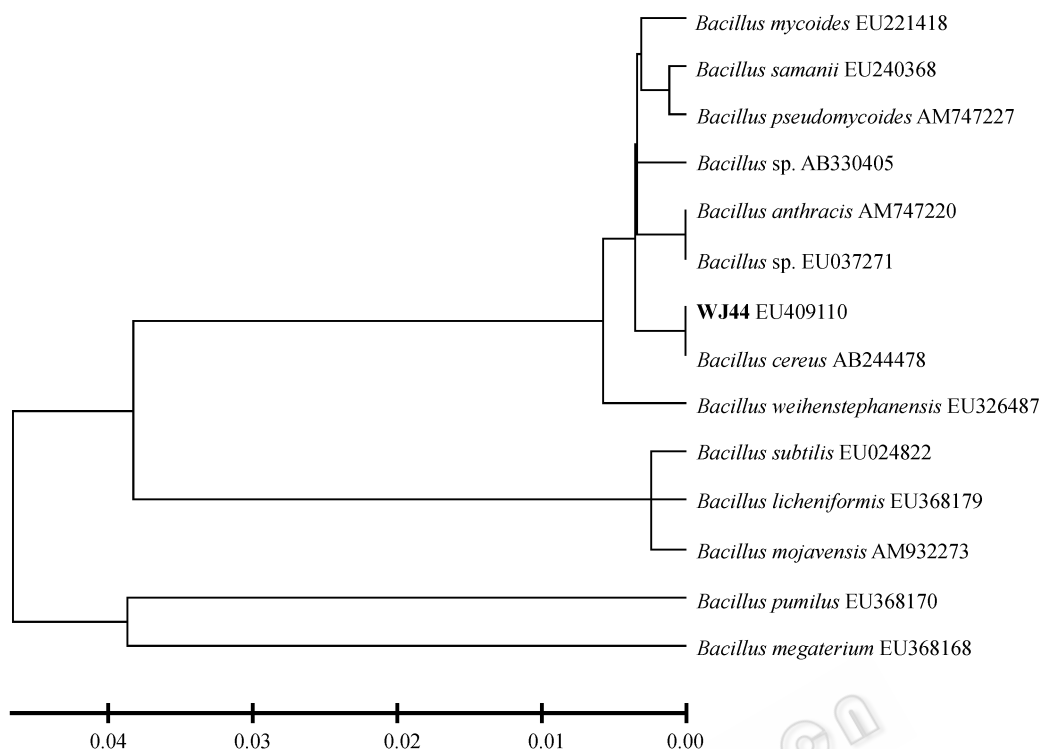


图1 WJ44菌株与芽孢杆菌属相关菌株的系统发育树

Fig. 1 The phylogenetic tree of WJ44 and some strains of *Bacillus* sp.

2.3 培养基成分对产酶的影响

2.3.1 碳源对产酶的影响: 培养基中分别加入 5 种不同常规碳源(20 g/L), 观察它们对菌体生长和产酶的影响。结果表明以葡萄糖作为碳源时适宜菌体生长($7.872 \text{ g/L} \pm 0.115 \text{ g/L}$), 酶活也明显较高($32.643 \text{ U/mL} \pm 0.754 \text{ U/mL}$)。如图 2 所示, 菌体的生长与葡萄糖浓度在 10 g/L~40 g/L 范围内成正比, 继续增大会抑制菌体生长, 酶活在浓度为 20 g/L 时达

到最大值, 所以 20 g/L 的葡萄糖浓度是比较合适的。

2.3.2 氮源对产酶的影响: 培养基中分别加入 9 种不同氮源(以初始培养基中 10 g/L 蛋白胨的含氮量作为添加标准), 考察单一氮源对产酶的影响。结果表明菌体利用有机氮产酶的情况明显优于无机氮, 蛋白胨($32.036 \text{ U/mL} \pm 0.445 \text{ U/mL}$)和鱼粉($29.657 \text{ U/mL} \pm 0.635 \text{ U/mL}$)尤为突出, 有机氮(除酵母膏)或者无机氮中的硫酸铵和尿素对菌体生长有利, 综合考虑确定以蛋白胨作为主要氮源。从图 3 来看, 菌体生长和酶活在一定范围内随着蛋白胨浓度的增大而逐渐上升, 在蛋白胨为 15 g/L 时达到最大值, 浓度继续增大会抑制菌体生长和酶活, 所以 15 g/L 的蛋白胨添加量是比较合适的。比较牛肉膏、酵母膏和鱼粉 3 种有机氮作为辅助氮源(5 g/L)时对产酶的影响发现, 以牛肉膏作为辅助氮源效果较好, 酶活达 $38.643 \text{ U/mL} \pm 0.625 \text{ U/mL}$ 。

2.3.3 玉米浆对产酶的影响: 玉米浆由于富含氨基酸和维生素而成为转氨酶生产中的一个重要的因素。从图 4 观察可知, 玉米浆浓度在 5 g/L~15 g/L 之间时, 菌体生长和酶活都会随其浓度增大而升高。玉米浆浓度大于 15 g/L 时, 浓度的增大会抑制菌体的生长和转氨酶酶活。

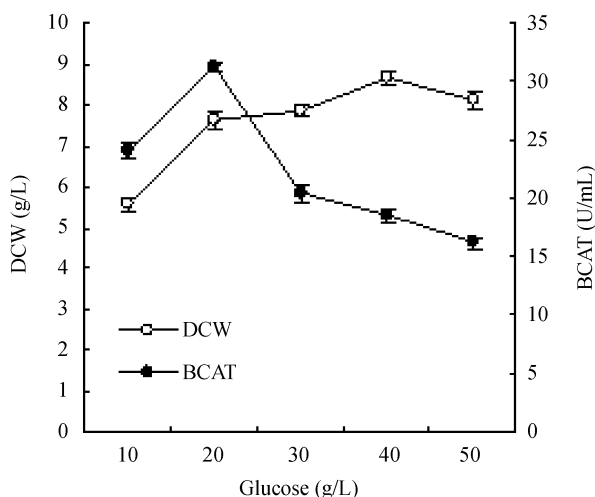


图2 葡萄糖浓度对菌体生长和产酶的影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of glucose on cell growth and enzyme production

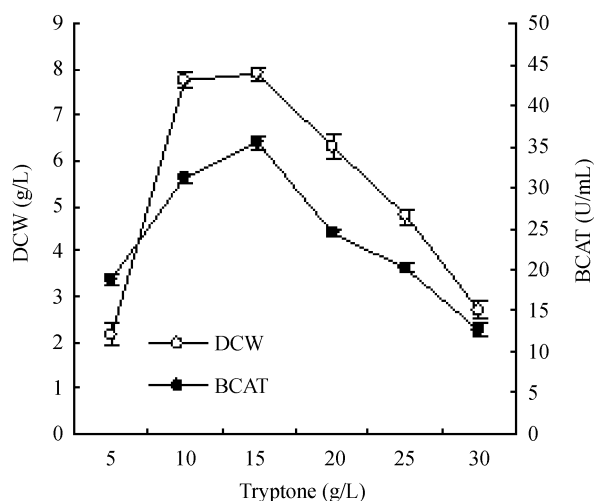


图3 蛋白胨浓度对菌体生长和产酶的影响

Fig. 3 Effects of different concentrations of tryptone on cell growth and enzyme production

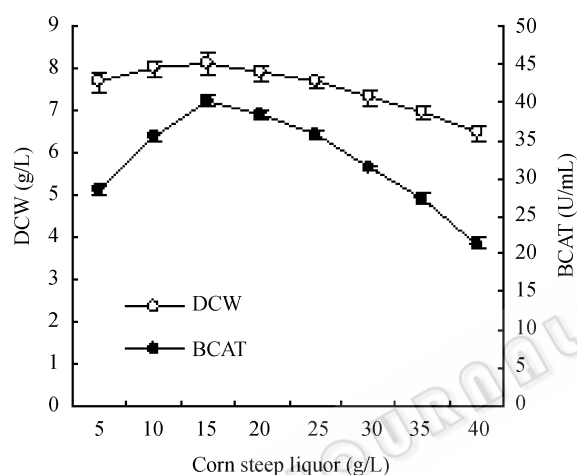


图4 玉米浆浓度对菌体生长和产酶的影响

Fig. 4 Effects of different concentrations of corn steep liquor on cell growth and enzyme production

2.3.4 KH_2PO_4 对产酶的影响: 如图5所示, 菌体干重在 KH_2PO_4 的添加量为 5 g/L 时达到最大, 而酶活会在添加量大于 3 g/L 时呈下降趋势, 综合考虑 KH_2PO_4 的添加量为 3 g/L 较为合适。

2.3.5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 对产酶的影响: 当 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度大于 0.7 g/L 时, 菌体生长会受到抑制, 酶活则在浓度大于 0.5 g/L 时呈下降趋势(图6), 所以保持 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度不变。

2.4 培养条件对产酶的影响

2.4.1 培养基初始 pH 值对产酶的影响: 从结果来看(图7), 酶活在 pH 6.5~7.5 之间保持较高水平。pH 7.0 时菌体干重和酶活均达到最大值, 菌体生长和酶活都会随着 pH 值的进一步升高受到抑制。所以培养基的初始 pH 值应为 7.0 比较合适。

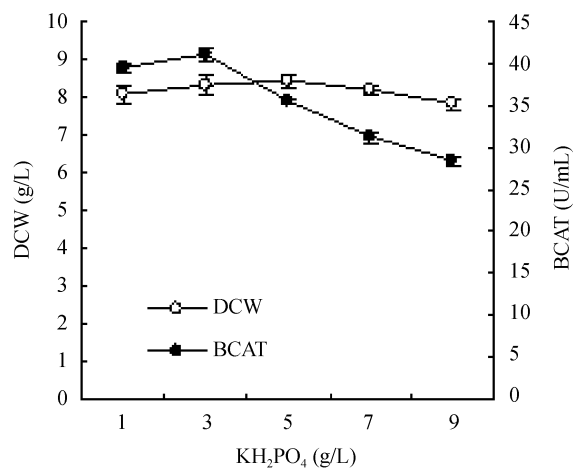
图5 KH_2PO_4 浓度对菌体生长和产酶的影响

Fig. 5 Effects of different concentrations of KH_2PO_4 on cell growth and enzyme production

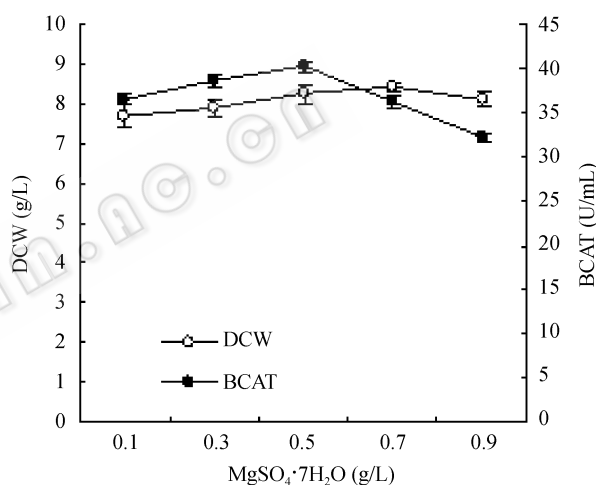
图6 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度对菌体生长和产酶的影响

Fig. 6 Effects of different concentrations of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ on cell growth and enzyme production

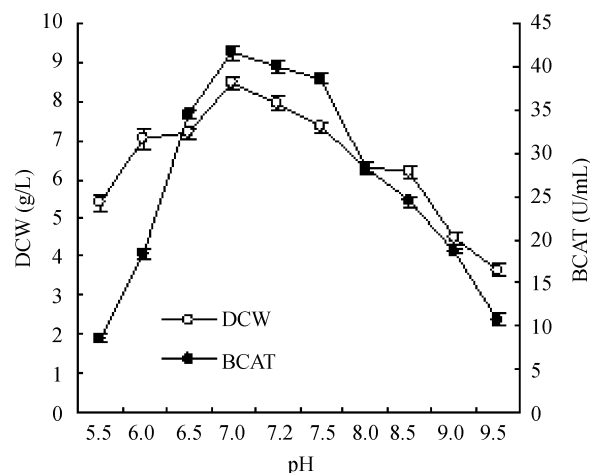


图7 pH 值对菌体生长和产酶的影响

Fig. 7 Effects of different pH on cell growth and enzyme production

2.4.2 装液量对产酶的影响: 250 mL 摇瓶装液量为 20 mL 时菌体生长和产酶情况最佳(图 8), 装液量大于 30 mL 时菌体干重及酶活下降很快。

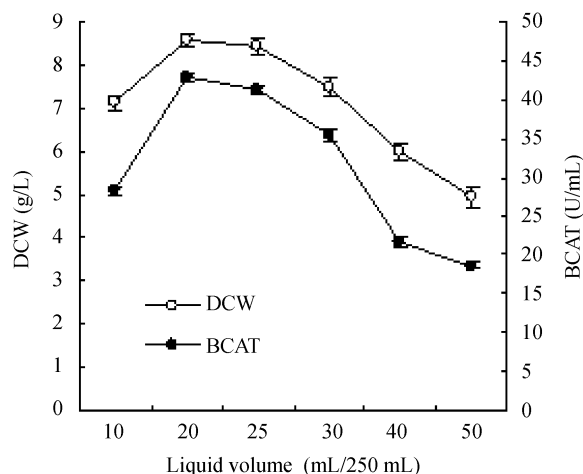


图 8 装液量对菌体生长和产酶的影响

Fig. 8 Effects of different liquid volume on cell growth and enzyme production

2.4.3 摇床转速对产酶的影响: 摇床转速在 150 r/min~220 r/min 之间时, 转速的增加使菌体生长变旺, 转速增大至 240 r/min 时, 菌体生长就会受到抑制(图 9)。摇床转速在 200 r/min 时接近产酶量的最大值, 所以 200 r/min 的转速是比较合适的。

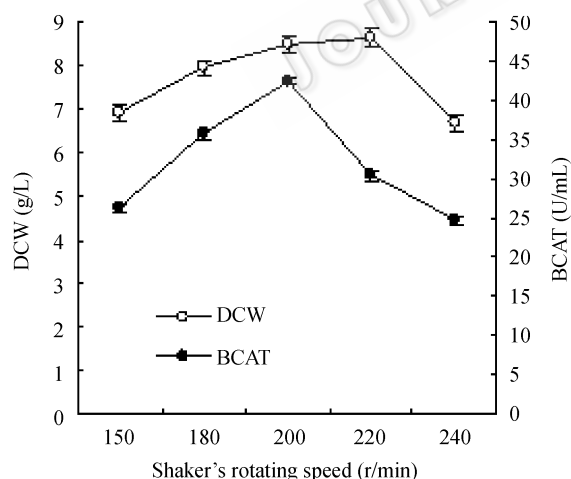


图 9 摇床转速对菌体生长和产酶的影响

Fig. 9 Effects of different shaker's rotating speed on cell growth and enzyme production

2.4.4 培养温度对产酶的影响: 如图 10 所示, 菌体干重随着培养温度的升高呈现先上升后下降的趋势。培养温度 37 时, 菌体生长最佳, 酶活变化情

况与菌体生长的趋势大致相同, 温度的进一步升高对酶活有很大的抑制作用, 所以最佳培养温度为 37 。

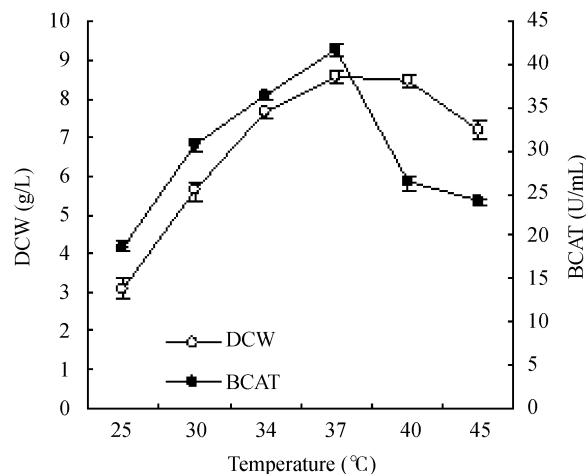


图 10 培养温度对菌体生长和产酶的影响

Fig.10 Effects of different cultural temperature on cell growth and enzyme production

2.5 摇瓶发酵产酶曲线

按照优化后的最佳产酶条件进行发酵, 结果显示(图 11)发酵 10 h 左右 BCAT 活力到达峰值 45.787 U/mL \pm 0.584 U/mL, 是优化前的 1.54 倍, 菌体干重为 8.643 g/L \pm 0.187 g/L。经过优化后菌株的产酶性能和生长状况有了一定的提高。

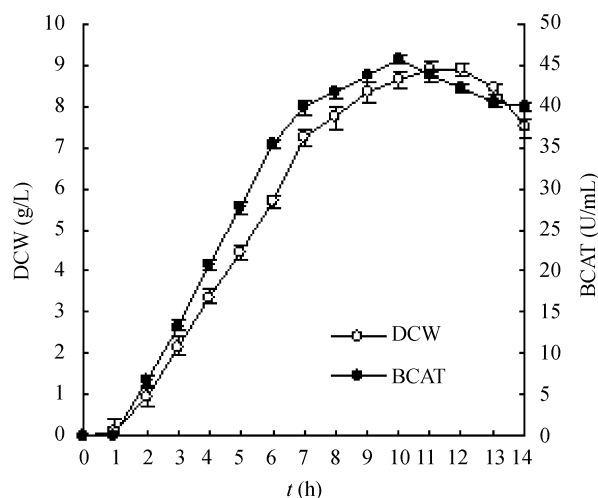


图 11 WJ44 摇瓶发酵产酶曲线

Fig. 11 The fermentation curve of WJ44

3 结论

从土壤中分离筛选出 1 株具有支链氨基酸转氨

酶活性的菌株 WJ44, 其亮氨酸转氨酶酶活达 $29.703 \text{ U/mL} \pm 0.621 \text{ U/mL}$ 。提取 WJ44 菌株的染色体 DNA, PCR 扩增后测定其 16S rRNA 序列, 进入 GenBank 数据库比对分析, 结合形态观察和生理生化鉴定结果, 鉴定其为一株蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)。经过对其产酶条件的优化, 表明培养基组成为葡萄糖 20 g/L、蛋白胨 15 g/L、牛肉膏 5 g/L、玉米浆 15 g/L、 KH_2PO_4 3 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, 初始 pH 7.0, 在 37 °C、200 r/min、装液量 20 mL/250 mL 的三角瓶中培养 10 h 其亮氨酸转氨酶酶活即可达到 $45.787 \text{ U/mL} \pm 0.584 \text{ U/mL}$, 是一株生长和产酶性能较佳的菌株。本工作的开展, 为进一步研究利用支链氨基酸转氨酶转化生产 α -酮酸提供了必要的基础。

参 考 文 献

- [1] Taylor R, Jenkins W. Leucine transaminase. II: Purification and characterization. *J Biol Chem*, 1966, **241**(91): 4396–4405.
- [2] Byung-Kwan C, Ho-Jung C, Sung-Hee P, *et al.* Simultaneous synthesis of enantiomerically pure (*S*)-amino acids and (*R*)-amines using coupled transaminase reactions. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, **81**(7): 783–789.
- [3] Yvon M, Rijnen L. Cheese flavor formation by amino acid catabolism. *Int Dairy J*, 2001, **11**(4): 185–201.
- [4] Goto M, Miyahara I, Hirotsu K, *et al.* Structural determinants for branched-chain aminotransferase isozyme-specific inhibition by the anticonvulsant drug gabapentin. *J Biol Chem*, 2005, **280**(44): 37246–37256.
- [5] Malatrasi M, Corradi M, Svensson J. A branched-chain amino acid aminotransferase gene isolated from *Hordeum vulgare* is differentially regulated by drought. *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, **113**(6): 965–976.
- [6] Søren M, Hans B, Peter R, *et al.* Cloning and inactivation of a Branched-Chain-Amino-Acid aminotransferase gene from *Staphylococcus carnosus* and characterization of the enzyme. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(8): 4007–4013.
- [7] Saito M, Nishimura K, Wakabayashi K, *et al.* Purification of branched-chain amino acid aminotransferase from *Helicobacter pylori* NCTC 11637. *Amino Acids*, 2007, **33**(3): 445–449.
- [8] Mireille Y, Emilie C, Alexander B, *et al.* Characterization and role of the Branched-Chain Aminotransferase (BcaT) isolated from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCDO 763. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(2): 571–577.
- [9] Inoue K, Kuramitsu S, Aki K, *et al.* Branched-chain amino acid aminotransferase of *Escherichia coli*: overproduction and properties. *J Biol Chem*, 1988, **104**(5): 777–784.
- [10] Monnier N, Montmitonnet A, Chesne S, *et al.* Transaminase B from *Escherichia coli*: purification and first properties. *J Biol Chem*, 1976, **58**(6): 663–675.
- [11] Goto M, Miyahara I, Hayashi H, *et al.* Crystal structures of branched-chain amino acid aminotransferase complexed with glutamate and glutarate: true reaction intermediate and double substrate recognition of the enzyme. *J Biol Chem*, 2003, **42**(13): 3725–3733.
- [12] 天津工业学院. 工业发酵分析. 北京: 中国轻工业出版社, 1999, pp.195–196.
- [13] 楼良旺, 高年发. 紫外分光光度法测定丙酮酸. 分析试验室, 2005, **24**(4): 11–13.
- [14] 潘光亮, 欧阳平凯. 利用转氨反应制备 L-苯丙氨酸. 南京化工学院院报, 1994, **16**(2): 33–36.
- [15] 赵 斌, 何绍江. 微生物学实验. 北京: 科学出版社, 2002, pp.38–42, 141–159.
- [16] 楼士林, 杨盛昌, 龙敏南, 等. 基因工程. 北京: 科学出版社, 2002, pp.27–28.
- [17] Thompson D, Higgins D, Gibson T. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *J Nucleic Acids Research*, 1994, **22**(22): 4673–4680.
- [18] Pettersson B, Shyama K, Mathias U, *et al.* *Bacillus siralis* sp. nov., a novel species from silage with a higher order structural attribute in the 16S rRNA genes. *Evol Microbiol*, 2000, **50**(6): 2181–2187.
- [19] Buchanan R, Gibbons N. 伯杰氏细菌鉴定手册. 中国科学院微生物研究所翻译组. 第八版. 北京: 科学出版社, 1984, pp.736–737.