

紫外线诱变选育高产 PHB 解聚酶的菌株*

次素琴 陈 珊** 刘东波 夏红梅

(东北师范大学生命科学院 长春 130024)

摘要: 以降解聚- β 羟基丁酸酯 (PHB) 的青霉 (*Penicillium* sp.) DS9713a 为出发菌株, 通过紫外线 (UV) 诱变分生孢子, 采用透明圈初筛和摇瓶复筛, 获得酶活高于原始菌株的突变株 5 株, 其中 DS9713a-CS01 突变株的 PHB 解聚酶活力高于对照 97.42%, 并对其酶学性质进行了初步研究。

关键词: 聚- β 羟基丁酸酯解聚酶, DS9713a 菌株, 紫外线诱变

中图分类号: Q939.96 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2653 (2005) 01-0038-06

Selection High-Yield PHB Depolymerase Producing Strain with UV

CI Su-Qin CHEN Shan LIU Dong-Bo XIA Hong-Mei

(School of Life Science, Northeast Normal University, Changchun 130024)

Abstract: Conidial suspension was obtained from the *Penicillium* sp. DS9713a which could decompose PHB. Through screening a lot of mutants with the methods of transparent zones and flask culture, five strains were selected from starting strain treated with UV and their activity were higher than the original. The best mutant strain named DS9713a-CS01, its enzyme activity was as 97.42% high as that of the original, furthermore, the characters of crude enzyme were studied.

Key words: Poly (β -hydroxybutyrate) depolymerase, DS9713a strain, UV mutation

聚- β 羟基丁酸酯 (PHB) 是微生物在非平衡生长状态下胞内合成和积累的碳源和能源的储藏物质, 以内含体的形式存在, 可达细胞干重的 90%^[1]。PHB 除了具有高聚物的基本性质外, 其可生物降解性和生物相容性倍受人们关注, 因此作为一种新型的可生物降解高分子材料具有广泛的应用前景。

PHB 的生物降解归因于许多细菌和真菌能够分泌胞外 PHB 解聚酶^[2,3]。国外从 60 年代陆续开展了有关降解 PHB 的工作, 但绝大部分菌株是近些年来获得的^[1]。这些菌株对 PHB 具有很好的降解作用, 所分泌的 PHB 解聚酶的最适 pH 为 5.5 ~ 9.8, 最适温度在 30℃ ~ 55℃, 但是, 解聚酶对温度和 pH 稳定性未见报道。近几年, 我国学者也开展了 PHB 生物降解的研究工作, 分离和筛选出了十几种可降解 PHB 的菌株^[4], 并对其降解特性和酶学性质进行了比较深入的研究^[5-8]。但是, 直接用从自然界中筛选的菌种产生的 PHB 降解酶的活性比较低, 降解 PHB 的速度比较缓慢。如果能够通过物理或化学等方法对已有 PHB 降解菌株进行诱变, 使其发生基因突变, 实现大幅度提高降解 PHB 的酶活, 不论从学术上还是从应用上都具有重要意义。本项工作就是在已有的可降解 PHB 菌株的基础上, 通过紫外线诱变, 获得了高产 PHB 解聚酶的菌株, 并进一步

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 29774031, 29834102)

Project Granted By Chinese National Natural Science Fund (No. 29774031, 29834102)

** 联系人 Tel: 0431-5709634, E-mail: chens093@nenu.edu.cn

收稿日期: 2004-03-15, 修回日期: 2004-06-30

研究了解聚酶的基本性质。

1 材料与方法

1.1 菌株

青霉 (*Penicillium* sp.), 编号 DS9713a, 为本实验室保藏菌株。

1.2 PHB

由中国科学院微生物研究所提供, 是微生物发酵的白色粉末, 熔点 173.8°C , 相对分子质量 7.31×10^5 。

1.3 培养基^[9]

PHB 0.15 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, NH_4Cl 0.1 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5 mg, KH_2PO_4 0.554 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.194 g, 定容至 1L, pH 6.8

1.4 PHB 粉末降解速率的测定 (点植培养法)

将无菌接种环蘸以极少量的孢子, 点植于平板培养基上适当位置, 使接种点位于等边三角形的 3 个顶点上。将培养基倒置于 28°C 恒温培养箱中, 培养 3 d 后观察结果。

1.5 PHB 膜降解速率的测定

PHB 膜的制备: 将 PHB 粉末在 180°C 热压机上预热 2 min, 保压 ($50 \text{ kg}/\text{cm}^2$) 1 min 后转移到冷压机上 (室温), 自然冷却到室温, 获得厚度为 0.1 mm 的 PHB 膜。

PHB 膜的降解^[10]: 将已称重的 PHB 膜放入三角瓶中, 接入菌种后置于 28°C 摇床培养 ($100 \text{ r}/\text{min}$), 定时取样。样品取出后, 用蒸馏水冲洗干净, 干燥后用分析天平称重量变化。

1.6 分生孢子悬液的制备

将活化菌种的分生孢子用无菌水洗入装有玻璃珠的三角瓶中, 28°C 振荡 10 ~ 20 min, 显微镜镜检, 孢子分散, 孢子浓度为 $10^6 \sim 10^7$ 个/mL。

1.7 紫外线诱变及突变株的筛选

灭菌平皿中装入 5 mL 分生孢子悬液, 在磁力搅拌器下用紫外灯 (30 W, 照射距离 15 cm ~ 20 cm) 照射, 时间为 20 ~ 80 s, 处理后的悬液在无菌室红灯下适当稀释^[11]。

初筛: 取上述菌悬液 0.2 mL 涂布于培养基上, 避光培养 2 ~ 3 d, 计数存活菌落, 计算存活率。选取单菌落, 点植法培养, 观察并定期测量菌落周围水解透明圈大小。

复筛: 根据初筛结果, 从固体平皿中挑取菌落透明圈直径明显大于原始菌株的菌落接入斜面培养基, 待长满后接入液体培养基中, 28°C 摇瓶培养 5 d, 每天取发酵液, 冷冻离心 30 min ($10,000 \times g$) 除去菌丝体, 检测上清液中 PHB 解聚酶的活力及蛋白含量。

1.8 酶活力测定

PHB 悬浮液的制备^[3]: 将 PHB 粉末溶于氯仿中, 所得溶液与十二烷基磺酸钠溶液混合, 混合液经超声波处理 5 min, 制得 PHB 乳化液, 加热除去氯仿, 得到 PHB 悬浮液。

酶活测定及酶活单位定义^[12,13]: 取 3 mL 悬浮液置于 40°C 恒温水浴, 待温度平衡后加入一定量的酶液, 反应 30 min 后, 于 650 nm 波长下测其光吸收 (降低)。

1 个酶活单位定义为: 每分钟引起光吸收降低 0.001 ($A_{650\text{nm}}$) 单位所需的酶量。

1.9 蛋白质的测定方法^[14]

按 Folin-酚 (Lowry) 方法测定, 以酪蛋白为标准蛋白。

2 结果与讨论

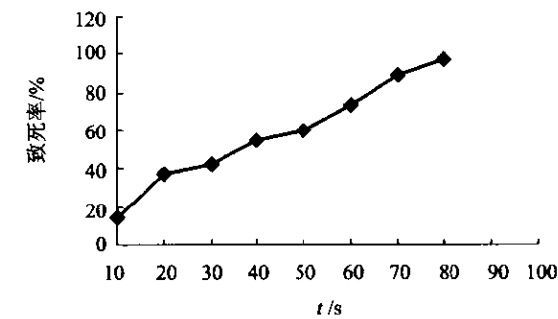


图 1 DS9713a 菌株经紫外线照射后的致死率

经过 60 s 紫外线照射的单菌落, 5 d 后测量菌落透明圈的直径, 其中有 11 株菌株的透明圈直径大于原始菌株, 结果见表 1。

为探讨突变株与原始菌株对 PHB 粉末的降解速率是否真正存在差异, 对表 1 所列数据进行了方差分析, 结果 $F = 4.2193 > F_{0.01} = 3.094$, 即 $P < 0.01$, 各菌株平均降解 PHB 粉末速率之间的差异达到极显著水平。为了解各菌株之间是否都有显著差异, 采用最小显著极差法 (LSR 法) 进行菌株间的多重比较, 得出以下结论: 经紫外诱变获得的 11 株突变株中, 01、11、07 菌株与原始菌株对 PHB 粉末的降解速率差异极显著。02、10、06 菌株与原始菌株差异显著。其余菌株虽然透明圈直径大于对照菌株, 但是没有显著性差异。

表 1 不同突变株对 PHB 粉末的降解实验

菌株	平均透明圈直径 (cm)	菌株	平均透明圈直径 (cm)	菌株	平均透明圈直径 (cm)
DS9713	2.8	04	3.0	08	3.0
01	3.7	05	3.0	09	3.0
02	3.4	06	3.2	10	3.3
03	3.1	07	3.5	11	3.6

2.2.2 摇瓶复筛: 通过摇瓶发酵的方法对原始菌株及初筛中结果较好的突变株进行培养, 每隔 24 h 取一定量的发酵液, 冷冻离心除去菌体, 对上清液进行酶活性和蛋白质含量的测定, 6 株突变株的酶活力达到最高峰的时间均为 72 h, 结果见表 2。

表 2 原始及突变菌株最高酶活及蛋白含量测定

比较项目	菌 株						
	DS9713a	01	02	06	07	10	11
酶活 (U/mL)	2.33	4.6	3.47	3.66	3.47	3.52	3.6
蛋白 (mg/mL)	0.143	0.17	0.18	0.154	0.162	0.135	0.129
酶活提高率 (%)	0	97.42	48.93	57.51	48.93	51.50	54.51

2.2.3 PHB 膜的降解性实验: 对 01、02、06、07、10、11 突变株进行 PHB 膜的降解性实验, 结果见图 2。由图 2 可以看出, 01、02、06、07、11 突变株对 PHB 膜的降解速率均快于原始菌株, 其中 01 菌株最快, 5 d 内可将培养液中的 PHB 膜完全降解。10

2.1 分生孢子的紫外线诱变

采用紫外线进行诱变, 由经验可知, 致死率达到 75% 左右时, 产生的正突变的几率较高, 有利于进一步的筛选。由图 1 可知, 经紫外线照射 60 s 后, DS9713a 菌株分生孢子的致死率为 73.68%。因此, 选用照射 60 s 的菌株做下一步的筛选。

2.2 PHB 解聚酶高产菌株的筛选

2.2.1 透明圈法粗筛: 采用点植法培养

突变株虽然在初筛和复筛中降解性能均优于原始菌株,但对 PHB 膜的降解反而比原始菌株慢。

2.2.4 遗传稳定性测定:将原始菌株及筛选出的突变株连续传代培养。结果表明,获得的 5 株突变株对 PHB 膜的降解特性稳定遗传,其中 01 菌株性能最佳,将其编号为 DS9713a—CS01 突变株。

2.3 粗酶液的基本性质

为检测原始菌种经紫外线诱变后,酶的性质是否发生变化,对原始菌株和 DS9713a—CS01 突变株粗酶液的性质进行初步研究。

2.3.1 粗酶液的最适反应温度:将 PHB 悬浮液分别置于 20℃ ~ 70℃ 的水浴中预热 10 min,然后加入一定量的酶液,保温 30 min,以蒸馏水作空白对照,以酶的最高活力为 100%,其余所得数据折合成剩余酶活力的百分数,测定酶液在不同反应温度下的相对酶活力,绘制酶活力-温度曲线,结果如图 3 所示。

由图 3 可以看出:DS9713a—CS01 突变株在 20℃ 时相对酶活力为 24.78%,随着温度的升高,酶活逐渐升高,在 40℃ ~ 55℃ 时酶活达到最高值,即 DS9713a—CS01 突变株的 PHB 解聚酶的最适反应温度为 40℃ ~ 55℃。温度继续升高至 65℃ 时,酶活仍为 46.52%,由此可见,DS9713a—CS01 突变株相对于原始菌株最适反应温度提高 10℃。

2.3.2 粗酶液的热稳定性:将原始菌株及 01 突变株的粗酶液分别置于不同的温度(20℃ ~ 55℃)保温,每间隔 30 min 取样测酶活,以酶的最高活力为 100%,其余所得数据折合成剩余酶活力的百分数,对保温时间作图,绘制酶活力-保温时间曲线,结果如图 4 所示。

由图 4 可知,DS9713a—CS01 突变株所产生的 PHB 降解酶在 20℃ ~ 50℃ 范围内稳定,原始菌株在 20℃ ~ 40℃ 范围内较稳定。由此可知,突变株相对于原始菌株有较高的温度稳定性。由图 4-A 中可以看到,DS9713a-CS01 突变株在 50℃ 保温到 2.5 h 后酶稳定性优于 40℃ 和 45℃,我们认为可能的原因是虽然此 PHB 解聚酶的最适反应温度在 40℃ ~ 55℃ 范围内,但酶活达到最高峰时是 50℃,在此温度下酶活性高并且稳定,因此在 50℃ 下酶经过 3h 保温后活力仍然较稳定,但具体原因有待进一步分析。

2.3.3 粗酶液的最适反应 pH:用 pH = 3.6 ~ 4.0 的乙酸-乙酸钠缓冲液, pH = 5.0 ~ 8.0 的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液, pH = 8.0 ~ 10.0 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液分别与 PHB 悬浮液配制成反应体系,测定原始菌株及 DS9713a—CS01 突变株粗酶液的酶活性,

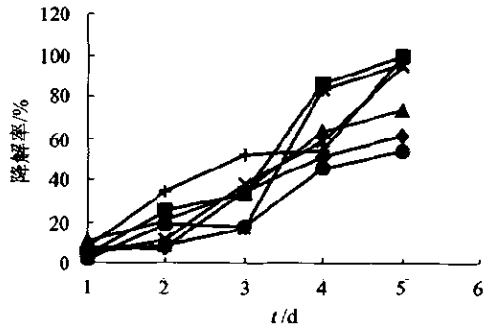


图 2 不同菌株对 PHB 膜的降解

◆ DS9713a, ■ 01, ▲ 02, × 06,
* 07, ● 10, + 11

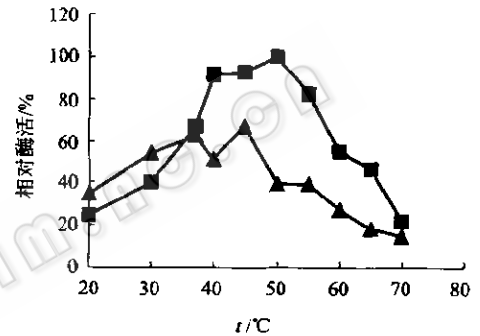


图 3 粗酶液的最适反应温度

■ DS9713a-CS01, ▲ DS9713a

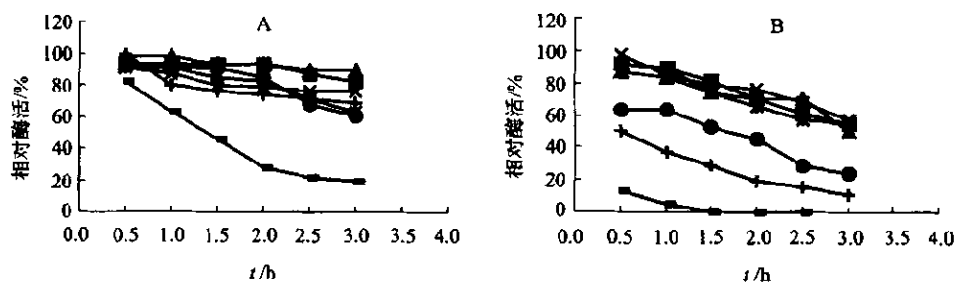


图4 温度对酶稳定性的影响

A: DS9713a-CS01 B: DS9713a

—■— 20℃, —▲— 30℃, —+— 37℃, —*— 40℃, —◆— 45℃, —+— 50℃, —■— 55℃

绘制酶活性-pH 曲线, 结果如图 5 所示。

由图 5 可以看出, 原始菌株的最适 pH 存在两个明显的峰, 即 pH6.4 和 pH8.6。因此我们可以推测, 原始菌株可能产生两种 PHB 解聚酶, 一种为酸性, 另一种为碱性。经过紫外线诱变后获得的突变株则只有一个明显的峰, 即 pH8.6, 而且在此 pH 下酶活力较高。由此可见, 原始菌株经紫外线诱变后, 位于酸性条件下的 PHB 解聚酶只是微弱性表达。

2.3.4 粗酶液的 pH 的稳定性: 将原始菌株和 DS9713a—CS01 突变株的粗酶液分别与不同 pH 的缓冲液混合, 在 40℃ 下保温 1 h, 按标准酶活法测其活力, 以在最适反应 pH 下所得的酶活力为 100%, 其余折合成剩余的百分数, 对不同的 pH 作图, 得到酶活力-pH 曲线, 如图 6 所示。

由图 6 可以看出, DS9713a—CS01 突变株的 PHB 解聚酶不论在碱性还是酸性条件下, pH 的稳定性较原始菌株都有显著的提高, 酸性条件下 pH5.8 时酶活保留 63.16%。在碱性条件下, pH8.0~9.2 时酶活力较为稳定。但原始菌株产生的 PHB 解聚酶只在 pH8.6 和 pH9.2 时较为稳定, 虽然酶的最适 pH 是酸性, 但在此条件下, 酶的稳定性极低。

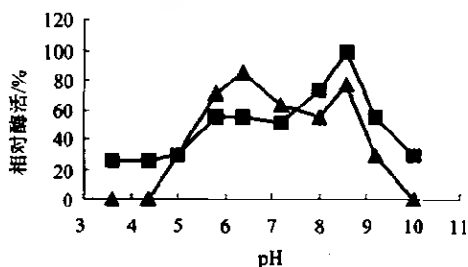


图5 粗酶液的最适反应 pH

—■— DS9713a-CS01, —▲— DS9713a

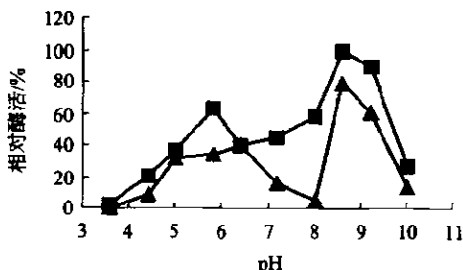


图6 粗酶液的 pH 稳定性

—■— DS9713a-CS01, —▲— DS9713a

综上所述, DS9713a 菌株经过紫外线 60 s 诱变后, 其降膜的速率和产酶量都有所提高。其中, 降膜速率的提高使得该菌种直接进行大规模的 PHB 降解成为可能。产酶量的提高对于下一步 PHB 解聚酶的分离纯化, 以及构建工程菌提供了可能。目前这一工作正在进行中。

参 考 文 献

- [1] Jendrossek D. *Polymer Degradation and Stability*, 1998, **59**: 317 ~ 325.
- [2] Jendrossek D, Handrick R. *Annu Rev Microbiol*, 2002, **56**: 403 ~ 432.
- [3] Jendrossek D, Schirmer A, Schlegel H G. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1996, **46**: 451 ~ 463.
- [4] 陈 珊, 刘东波, 夏红梅, 等. *应用与环境生物学报*, 2003, **9** (4): 395 ~ 399.
- [5] 陈 珊, 刘东波, 夏红梅, 等. *菌物系统*, 2001, **20** (3): 423 ~ 425.
- [6] 陈 珊, 刘东波, 夏红梅, 等. *分子科学学报*, 2002, **18** (4): 220 ~ 225.
- [7] 陈 珊, 刘东波, 夏红梅, 等. *微生物学通报*, 2002, **29** (3): 50 ~ 54.
- [8] 陈 珊, 刘东波, 夏红梅, 等. *生物化学与生物物理进展*, 2002, **29** (1): 110 ~ 113.
- [9] Satio T, Suzuki K. *Journal of Bacteriology*, 1989, **171**: 184 ~ 189.
- [10] Tomasi G, Scandola M. *Macromolecules*, 1996, **29**: 507 ~ 513.
- [11] 章名春. *工业微生物诱变育种*. 北京: 科学出版社, 1984. 60 ~ 70.
- [12] Tanio T, Fukui T. *Eur J Biochem*, 1982, **124**: 71 ~ 77.
- [13] Shirakura Y, Fukui T, Saito T. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1986, **880**: 46 ~ 53.
- [14] Lowy O H, Rosebrough N J, Farr A L, *et al.* *J Bio Chem*, 1951, **193**: 265 ~ 275.