

用桔红诺卡氏菌发酵生产胆固醇氧化酶

胡 军

(上海市工业微生物研究所, 上海)

Robert Foster

(Cranfield Biotechnology Centre, Cranfield Institute of Technology, Cranfield, England)

摘要 采用蛋白胨改良培养基及底物诱导方法, 以桔红诺卡氏菌 (*Nocardia rhodochrons*) 发酵生产胆固醇氧化酶。酶活力最高可达 487.5 u/l (国际单位)。研究了发酵条件对微生物生长和产酶的影响, 酶的分离和提取方法。粗酶液经 DE-52 柱层析后, 酶纯度可提高 10 倍。

关键词 胆固醇氧化酶; 发酵; 诱导产酶

由于胆固醇氧化酶在血清胆固醇分析方面的应用日益增加, 在过去几年中人们对大规模生产, 分离和纯化胆固醇氧化酶的兴趣大大增强。

本工作着重于培养基的改良和诱导剂添加对产酶的影响的研究。由于胆固醇氧化酶是结合在细胞膜上的胞内酶, 尽管对各种微生物胞

内外酶的提取等已有较多报道, 但对胞内结合在细胞膜上的一类酶的分离和提取却报道不多, 本工作采用缓冲液加 Triton X-100 去垢剂的方法, 获得较好的结果。

感谢 John Higgins 教授对本研究的大力支持, S. P. Heudry 博士对本工作提出建设性意见。

材 料 和 方 法

(一) 材料

1. 菌种: 桔红诺卡氏菌 (*Nocardia rhodochrous*) NCIB 10554。

2. 斜面培养基: (g/L) 牛肉膏 10, 酵母膏 20, 蛋白胨 50, 氯化钠 50, 琼脂 15。菌种斜面每二星期转接一次。4℃ 保藏备用^[1]。

3. 发酵培养基 (g/L): 甘油 10, 蛋白胨 20, 酵母膏 10, (NH₄)₂SO₄ 2, K₂HPO₄ 2, CaCl₂ 0.01, FeSO₄ 0.01, MgSO₄ 0.1。250 毫升摇瓶内装 30 毫升上述液体培养基, 接种后在 30℃, 旋转式摇床 250—300 r/min, 培养 24 小时后再转入 5 升摇瓶的同一培养基中, 同时添加诱导剂胆固醇 1 g/L, 在 30℃ 150—200 r/min 旋转床培养 40—48 小时。收集细胞后用 5m mol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.0) 清洗, 离心收集沉淀物于 -20℃ 冰冻过夜, 供提取用。

(二) 方法

1. 酶的分离和提取: 50 克 (湿重) 细胞悬浮于 10 毫升磷酸钾缓冲液 (5 m mol/L, pH 7.0), 内含 0.5% (V/V) 三硝基甲苯 X-100 表面活性剂, 在室温振荡过夜, 然后冷冻离心分离 (10,000 × g) 30 分钟, 取上清液作为粗提酶液。

粗酶液用阴离子交换树脂 DE-52 层析纯化: 将 10 克 DE-52 离子交换树脂用磷酸钾缓冲液 (5m mol/L, pH7.0) 内含 0.5% (V/V) 三硝基甲苯 X-100 平衡过夜, 然后装入直径 2 厘米的玻璃柱内, 树脂床高 3 cm。用 5 ml 粗酶液泵入柱内, 则胆固醇氧化酶可全部吸附在 DEAE 纤维素柱上。然后再用 50 m mol/L 磷酸钾缓冲液洗脱, 即可将酶洗脱下来, 而获纯度高 10 倍的胆固醇氧化酶。而粗酶液中的许多杂蛋白和催化酶则仍吸附在 DEAE 纤维素柱上。

2. 酶的分析测定^[2]: 胆固醇氧化酶用 Richmond 法测定。新配 6 mmol/L 胆固醇 (溶于异丙醇) 50 μl, 酶液 50 μl, 加入 3 ml 缓冲液中 [内含 0.15% (V/V) 三硝基甲苯 X-100]。将上述液体混合, 在 240 nm 紫外光波测定吸收增加速率。以不加酶液的同一缓冲液作为对

照。测定仪用 CE594-双光谱分光光度计, 附配一架 BD4 读数电脑控制器。

胆固醇氧化酶活力计算公式如下:

$$\frac{\Delta A \times \text{反应体积} \times 0.082}{\text{酶液体积}} = 5.1 \times \Delta A \text{ (u/ml)}$$

结 果

(一) 诱导剂对产酶的影响

已有一些文章报道了在胆固醇氧化酶发酵时加入诱导剂可提高产酶^[1]。本工作对诱导剂添加的最适时间作了研究, 结果见表 1。

表 1 诱导物的不同添加时间对产酶的影响

发酵时间 (h)	0	6	12	18	24	30	36	40
酶活力 (u/L)	430	287	315	305	295	316	215	132

表 1 表明胆固醇诱导剂在接种时同时加入, 酶产量有较大的增加, 同时可减少染菌机会。对诱导剂添加量的研究说明, 过多的诱导剂添加并不增加更多酶产量。胆固醇诱导剂添加量在 0.5—1.5 g/l, 其酶产量为最佳 (表 2)。

表 2 诱导剂浓度对产酶的影响

诱导剂浓度 (g/L)	0	0.25	0.5	1	1.5	2	2.5
酶活力 (u/L)	22	80	468	487.5	460	405	356

(二) 发酵时间对产酶的影响

一般而言, 诺卡氏菌的生长速率要比其它细菌慢, 因此酶生产的发酵时间控制比较严格。发酵时间过长, pH 会急剧下降导致酶活收率降低。图 1 表明, 发酵在 36—40 小时内为最佳。

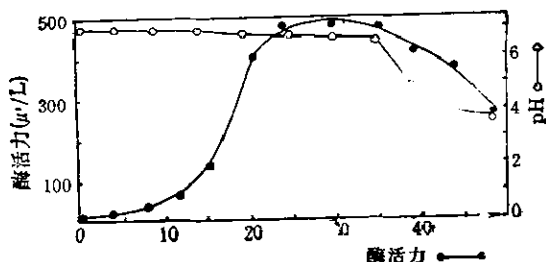


图 1 发酵时间对产酶的影响

(三) 氮源对产酶的影响

原料选择对产品的工业化生产是重要的先

决条件。作者用蛋白胨全部取代或取代一半酵母膏来进行胆固醇氧化酶的发酵生产。表 3 说明诺卡氏菌在蛋白胨-酵母膏混合培养基上生长良好,且有较高的酶活力产生。在酵母膏培养基上的产酶情况不如蛋白胨培养基和蛋白胨-酵母膏混合培养基。表 4 表明不同蛋白胨含量培养基的产酶情况。

表 3 不同氮源对产酶的影响

氮 源	蛋白胨	酵母膏	蛋白胨-酵母膏
酶活力 (u/L)	465.7	358.7	487.5

表 4 不同蛋白胨浓度对产酶的影响

蛋白胨浓度 (g/L)	0	5	10	15	20	25
酶活力 (u/L)	17.5	99.5	120	378	382	380

各组发酵条件试验(表 1—表 4),均以前述发酵培养基为参照基础;除诱导剂添加试验外,各组培养基中均加入 1g/L 胆固醇作为诱导剂。

(四) 冷冻处理对提取胞内酶的影响

冷冻处理与否,对结合在细胞膜上的胞内酶的提取有很大影响。从新鲜细胞中提取获得的酶大约只及冷冻处理后提取酶的三分之一。采用去垢剂-缓冲液法提取胆固醇氧化酶,其原理是断开细胞膜脂质同酶之间的疏水键,从而释放出大量的酶。冷冻处理后可获得高产量的酶是因为冷冻脱水后的细胞其膜脂质低于向热迁移温度,而使得脂-蛋白质之间的联键减弱,便于去垢剂抽提的结果^[4]。酶的抽提时间是影响产酶量的另一因素(表 5)。

表 5 抽提时间对胆固醇氧化酶产量的影响

抽提时间 (h)	0	1	4	8	16	20	24
酶活力 (u/L)	15.2	250	275	355	449	478	460

(五) 胆固醇氧化酶的初提纯

由于经过抽提之后的上清液中总蛋白含量已大大降低,因而采用离子交换柱层析法对胆固醇氧化酶的纯化比较适合。根据胆固醇氧化酶的分析实例,酶纯度只要达到并超过每毫升 1 个国际单位就能满足临床分析的要求^[5]。采

用不同离子强度的磷酸钾缓冲液 (5—150 mmol/L) 进行分部洗脱,以 50 mmol/L 浓度的磷酸钾缓冲液洗脱之收集液的酶活力最高 (表 6)。

表 6 DE-52 柱层析纯化胆固醇氧化酶*

柱体积 (ml)	总处理量 (ml)	处理后酶液 (ml)	回收率 (%)**	比活力 (u/mg)	纯化倍数
10	100	8	80	6.8	10

* 粗酶液之酶活力为 0.487 (u/ml)

** 回收率是指从粗提酶液纯化后的回收,不包括在抽提过程中的酶活损失

讨 论

本研究试图说明生长条件对诺卡氏菌产胆固醇氧化酶的影响及其抽提和纯化的方法。结果表明在 250 毫升和 5 升摇瓶发酵时,胆固醇诱导剂对产酶有很大影响。采用蛋白胨-酵母膏混合培养基要比酵母膏-甘油培养基的产酶高。究竟培养基的何种成份影响了最终产酶,目前尚不清楚。

据信胆固醇氧化酶联接在桔红诺卡氏菌的细胞膜表面,因而可采用 Triton X-100 抽提,由于微生物细胞壁会随培养条件的不同而发生变化,因此测定了抽提酶的不同时间。

鉴于经抽提的上清酶液中杂蛋白量已大大降低,故采用 DE-52 离子交换树脂层析纯化酶的方法,经实验证明该法不失为一种简便而有实效的纯化胆固醇氧化酶的方法。

通过本研究可初步得出桔红诺卡氏菌 (NCIB 10544) 是一株极有潜力的胆固醇氧化酶生产菌。

参 考 文 献

[1] Cheetham, P. J.: *J. of Applied Biochemistry*, 1:51—59, 1979.
[2] Buckland, B. C. et al.: *Biotechnology and Bioengineering*, 17:601—621, 1976.
[3] Richmond, W.: *Clinical Chemistry*, 12: 1350—1356, 1973.
[4] Buckland, B. C. et al.: *Industrial Aspects of Biochemistry*, 30: 65—79, 1974.
[5] Cheetham, P. J.: *Enzyme Microb. Technol.*, 2: 201—205, 1980.