

# 一种胆固醇氧化酶高产菌株筛选方法的建立

霍惠芝 张 玲 孙 艳 杨海麟 王 武\*

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214122)

**摘 要:** 用亚硝基胍(1 mg/mL)与超声波(200 W, 50 kHz)复合诱变的方法, 对产胆固醇氧化酶短杆菌 *Brevibacterium* sp. DG CDC-82 进行诱变处理, 得到一株桔红色突变株其产胆固醇氧化酶能力提高 140%, 酶活达到 1.24 U/mL, 又用同样的方法对桔红色突变株进行回复突变处理, 得到一株白色回复突变株和一株淡粉色回复突变株, 两株回复突变株产胆固醇氧化酶的能力又明显下降, 酶活分别为 0.17 U/mL 和 0.69 U/mL。说明短杆菌 *Brevibacterium* sp. 产胆固醇氧化酶能力与其产红色素成正相关偶联关系, 这种相关性模型的建立可以作为以后诱变或定向进化研究的筛子。

**关键词:** 胆固醇氧化酶(COD), 短杆菌, 红色素, 复合诱变, 回复突变

## A Novel Screening Method for Isolating High Cholesterol Oxidase Producing Strain

HUO Hui-Zhi ZHANG Ling SUN Yan YANG Hai-Lin WANG Wu\*

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

**Abstract:** The cholesterol oxidase producing strain *Brevibacterium* sp. DG CDC-82 was treated with NTG (1 mg/mL) under ultrasonic vibration (200 W, 50 kHz). A red mutant named *Brevibacterium* sp. DG CCN-25 showed higher and stable production of cholesterol oxidase was obtained. The enzyme activity was increased by 140%, it is 1.24 U/mL. Then dealt with DG CCN-25 using the same method, two revertants were obtained, one was white and the other was rose pink. The enzyme activity of two revertants was obvious decrease, they are 0.17 U/mL and 0.69 U/mL. The results showed the positive correlation between COD activity and red pigment producing by *Brevibacterium* sp.. The relativity model can be used as a method of screening for mutation and directed evolution.

**Keywords:** Cholesterol oxidase(COD), *Brevibacterium* sp., Red pigment, Dual-mutation, Reverse mutation

胆固醇氧化酶(COD, EC1.1.3.6)是胆固醇代谢途径第一步反应的关键酶, 能专一性的催化胆固醇转化为胆甾-4-烯-3-酮(胆甾烯酮)和  $H_2O_2$ <sup>[1-3]</sup>。胆固醇氧化酶在食品开发、医疗保健、临床检测、生物农药等方面具有极广泛的应用价值<sup>[4-6]</sup>。

目前报道的产胆固醇氧化酶的微生物多是链霉菌和短杆菌, 其他菌种研究的较少。2001 年, Tabatabaei Y M 等<sup>[7]</sup>利用链霉菌发酵得到 900 U/L 的纯酶; 2003 年, Varma R 等<sup>[8]</sup>利用链霉菌发酵得到 200 U/L 的酶。2006 年王发合等<sup>[9]</sup>以类芽胞杆菌发

醇酶活为 221.20 U/L。短杆菌方面近几年的报道多是基因方面,发酵方面没有太大进展。本实验室从土壤中分离获得一株产胞内胆固醇氧化酶的短杆菌,产酶水平为 60 U/L,经过多种诱变方法处理,突变株产酶水平达到了 505 U/L(季文明,无锡轻工大学博士学位论文,2000)。为了进一步提高该菌胆固醇氧化酶的生产水平,本研究借鉴桑吉等采用超声波与亚硝基胍复合诱变的手段<sup>[10]</sup>,取得了明显的诱变效果,突变株的产酶水平达到了 1210 U/L。又采用复合诱变的方法对突变株进行了回复突变,研究了其产酶与红色素的关系,建立了一种简便的筛选高产酶菌株的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 菌种:产胆固醇氧化酶菌株 *Brevibacterium* sp. DG CDC-82 为本实验室自筛保藏菌株。

1.1.2 主要试剂:亚硝基胍(NTG) 购自德国 Fluka 公司;辣根过氧化物酶购自上海双向西巴斯科技发展有限公司

1.1.3 培养基:种子培养基(g/L):牛肉膏 3,蛋白胨 10, NaCl 5, 蒸馏水 1L, pH7.5.

完全培养基(g/L):牛肉膏 3,蛋白胨 10, NaCl 5, 琼脂 20, 蒸馏水 1L, pH7.5.

发酵培养基(g/L):胆固醇 3, 酵母膏 8, NaCl 1, CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> 2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01, CaCl<sub>2</sub> 0.1, 吐温-80 3 mL, 蒸馏水 1 L, pH7.5.

### 1.2 实验方法

1.2.1 发酵条件:完全培养基斜面活化 48 h, 接一环到 50 mL 种子培养基中, 30~200 r/min 振荡培养 14 h。发酵条件:500 mL 三角瓶装液量 100 mL, 接种量 10%, 30~200 r/min 振荡培养。

1.2.2 胆固醇氧化酶酶活测定方法:3 mL 溶液 A(4-氨基-安替比林, 1 mmol/L; 苯酚, 6 mmol/L; 叠氮钠, 0.2 g/L; 过氧化物酶, 5000 U/L; 磷酸钾缓冲液,

25 mmol/L, pH7.5), 150  $\mu$ m 溶液 B (胆固醇, 8.26 mg/mL; Triton X-100, 4.26%; 异丙醇为溶剂), 50  $\mu$ L 酶液, 37<sup>o</sup>, 反应 5 min, 沸水浴 3 min, 于 500 nm 测吸光值。酶活(U/mL)=1.6832 $\times$ OD<sub>500</sub>。

1.2.3 出发菌株处理:出发菌株经完全培养基连续两次平皿活化, 接种至 50 mL 种子培养基, 30~200 r/min, 培养至对数生长期(约 14 h), 5000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, pH6.0 的磷酸缓冲液稀释至原体积, 振荡, 同条件离心, 反复重复 2 次, 制成单细胞菌悬液。

1.2.4 超声波结合亚硝基胍诱变处理:取出发菌悬液 5 mL 置于无菌玻璃试管内, 处理条件为:冰水浴, 亚硝基胍浓度为 1 mg/mL, 超声 200 W, 50 kHz, 超声间隙处理 9 次, 每次处理 5 min, 其间停 3 min。诱变结束后, 采用 5000 r/min, 离心 10 min, 收集菌体, 并用 pH7.0 的磷酸缓冲液稀释至原体积, 振荡, 同条件离心, 反复重复 2 次, 除去亚硝基胍。

1.2.5 突变株红色物质提取与全波长扫描分析:取发酵液 100 mL, 5000 r/min 离心 10 min 取菌体, 菌体悬浮于 30 mL pH7.0, 0.05 mol/L 磷酸钾缓冲液, 超声处理 (200 W, 50 kHz, 间歇处理, 每次 5 min, 其间停 1 min)。超声 4 次后, 8000 r/min 离心取上清, 加入 20 mL 甲醇振荡均匀, 静置 2 h, 8000 r/min 离心 10 min, 取上清, 水浴蒸干, 溶解于 50 mL 甲醇溶液, 8000 r/min 离心 10 min, 取上清。

## 2 结果与分析

### 2.1 诱变剂量的确定

采用亚硝基胍和超声波联合处理以致死率为考察指标, 复合诱变中超声波处理总时间分别为 5 min、10 min、15 min、20 min、25 min、30 min、35 min、40 min、45 min、50 min, 实验结果见表 1。当亚硝基胍浓度为 1 mg/mL, 超声处理 35 min, 致死率为 90%, 故确定复合诱变的条件为亚硝基胍 1 mg/mL, 200 W 50 kHz 超声强度, 处理 35 min。

表 1 复合诱变致死率  
Table 1 Lethality rate of dual-mutation

超声处理总时间 Ultrasonicztion time (min)	5	10	15	20	25	30	35	40	45
致死率 Lethality rate(%)	2.8	20	39	56	66	80	90	92	97

2.2 红色突变株的生理生化鉴定

通过筛选得到的菌株与出发菌株相比，菌落形态特征有了很大变化。出发菌株生长前期为乳白色菌落，边缘整齐，表面光滑、潮湿，后期颜色转变为棕黄色。25#突变株生长期均为桔红色，菌落边缘整齐，表面光滑、潮湿（如图 1，图 2）。



图 1 出发株菌落  
Fig.1 Inaugural starins

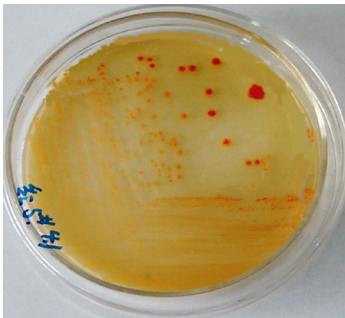


图 2 突变株菌落  
Fig. 2 Mutant starins

生理生化鉴定，实验证明与出发菌株相比，突变株的生理生化特征没有明显变化，目前可以确定其突变为产酶提高型和菌落颜色变化的形态突变型，将此突变株命名为 DGCCN-25。

该突变株经过 8 次传代接种后，每次发酵水平相差不大，菌种颜色无变化都为桔红色，故可以得出结论，该菌种遗传稳定性较稳定，不会发生自发回复突变(表 2)。

为鉴定其突变类型选择了部分特征培养基进行

表 2 DGCCN-25 遗传稳定性实验 Table 2 Hereditary Stability experiment of DGCCN-25								
转接代数 Passage number	1	2	3	4	5	6	7	8
发酵酶活(U/mL) Enzyme activity	1.212	1.221	1.197	1.235	1.260	1.193	1.230	1.246

2.3 突变株与原始菌株产酶比较

从图 3 中可以看出突变株 DGCCN-25 与出发菌株 DG CDC-82 相比，产酶高峰提前约 6 h，产酶能力提高约 140%，这表明诱变菌株的产酶特性发生改变，产 COD 活力提高，利用胆固醇的效率提高。

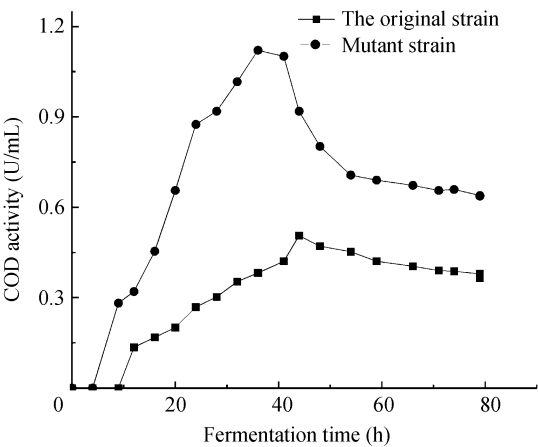


图 3 DG CDC-82 与 DGCCN-25 发酵产 COD 比较  
Fig. 3 Compare of production COD between DG CDC-82 and DGCCN-25

2.4 红色素粗提取后进行全波长扫描

如图 4 所示，红色素在 280 nm 和 450 nm 均有吸收峰，但 280 nm 是蛋白的特殊吸收峰不能排除是杂质蛋白，又因为物质呈桔红色，根据资料<sup>[11]</sup>其特殊吸收应该是 450 nm。所以通过测定红色素在 450 nm 处的 OD 值来确定它的含量。

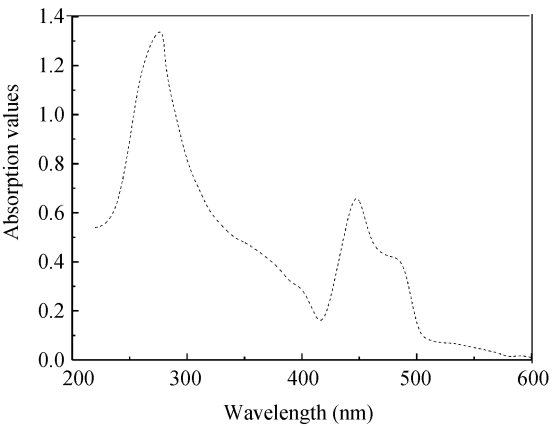


图 4 红色素全波长扫描图  
Fig. 4 The absorption spectrum of the pigment

## 2.5 DGCCN-25 发酵不同时间 COD 与红色素的关系

从图 5 中可以看出, 随着发酵时间的延长, COD 酶活与红色物质的含量成偶联正比关系。胆甾-4-烯-3-酮是 COD 分解胆固醇的产物, 如图 6 显示, 红色素含量与胆甾-4-烯-3-酮含量成负相关, 这可能是因为 COD 分解胆固醇的产物胆甾-4-烯-3-酮在代谢流上趋于红色素的合成方向, 胆甾-4-烯-3-酮可能是红色素的前提物质。

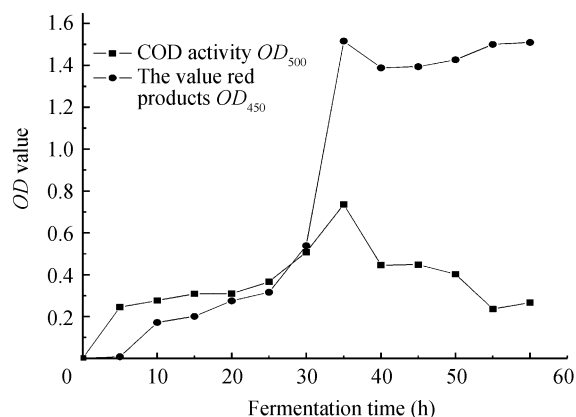


图 5 DGCCN-25 发酵不同时间酶活与红色素的关系

Fig. 5 Relation of DGCCN-25 COD activity and pigment in different fermentation time

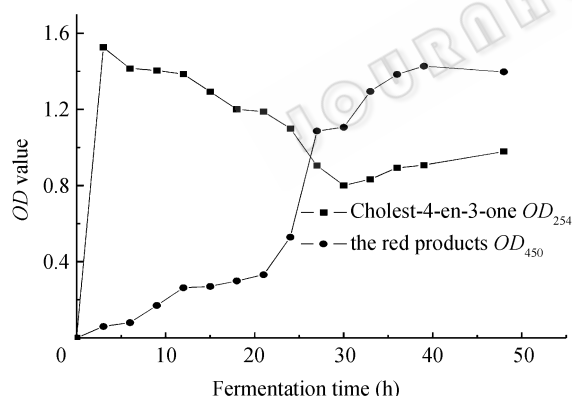


图 6 DGCCN-25 发酵不同时间胆甾-4-烯-3-酮与红色素关系

Fig. 6 Relation of DGCCN-25 4-Cholest-en-3-one and pigment in different fermentation time

## 2.6 回复突变法验证 COD 酶活与红色素的偶联关系

用与诱变相同的方法对突变株 DGCCN-25 进行回复突变, 得到 2 株回复突变株(如图 7, 图 8)。

从图 9 中可以看出, 回复突变株 1, 2 的产酶能力明显降低。红色菌株发酵在约 35 h 达到最高酶活

1.24 U/mL; 粉色菌株发酵在约 24 h 达到最高酶活, 为 0.69 U/mL; 白色菌株发酵在约 24 h 达到最高酶活 0.17 U/mL。



图 7 回复突变株 1(白色)

Fig. 7 Revertant 1(white)



图 8 回复突变株 2(淡粉色)

Fig. 8 Revertant 2(rose pink)

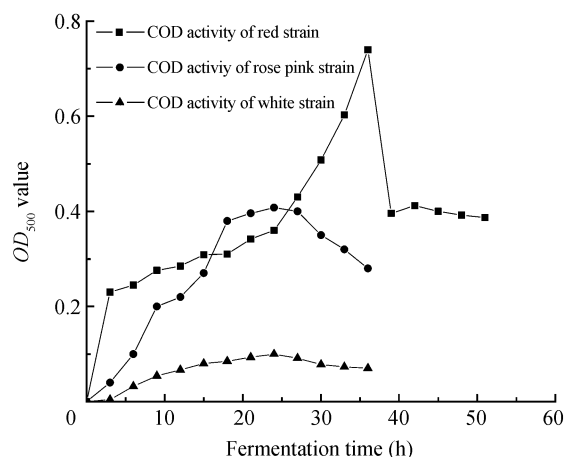


图 9 回复突变株与 DGCCN-25 发酵酶活比较

Fig. 9 Compare of production COD between DGCCN-25 and revertants

以上结果反面证明了胆固醇氧化酶与红色素之间的正相关偶联关系, 红色素的含量越多酶活越高,

红色素的含量越少酶活也越低。此特征可以作为高产菌种的筛选方法。

### 3 结论

尽管基因工程技术已开始用于工业生产菌株的高产菌株构建,但传统的物理化学诱变因子,如紫外线、低能离子、亚硝基胍等仍为遗传育种不可或缺的手段。传统的诱变育种在向更高效的方向发展,主要集中在采用更有效的诱变手段和建立简单、准确、高效的筛子上。本实验将超声波与亚硝基胍两种传统的诱变手段结合起来,同时处理出发菌株,取得了较好的诱变效果,获得 1 株产酶活力提高 140% 的红色突变株。又用相同的方法对突变株进行处理,得到 2 株回复突变株。这 2 株回复突变株在颜色变淡的同时,产酶能力也在降低。相对于红色突变株,白色回复突变株产酶活力降低了 80%,淡粉色回复突变株产酶活力减低了 44%。比色法证明在发酵过程中红色素的含量与 COD 的酶活成正比偶联关系, COD 分解胆固醇产物胆甾-4-烯-3-酮的含量在发酵过程中与红色素的含量成反比。以上结果充分说明菌体产酶能力与红色素的含量成正比偶联关系,菌体的颜色越深其产酶能力也越强,为以后高产菌种的筛选和基因的定向进化建立了一种简洁、快速的筛选方法。

### 参 考 文 献

[1] Charles CA, Poon LS, Chan CGS, *et al.* Enzymatic det-

ermination of total serum cholesterol. *Clin Chem*, 1974, **20**(2): 470-475.

[2] Smith GA, Brooks JW. Cholesterol Oxidases: Properties and Application. *Steroid Biochemistry*, 1976, **7**(9): 705-713.

[3] 吕陈峰, 陈毅力, 王龙刚, 等. 利用胆固醇氧化酶转化胆固醇制备胆甾 4-烯-3-酮. 无锡轻工大学学报, 2001, **20**(5): 485-488.

[4] Lebovics VK, Magdolna A, Odon G. Enzymatic determination of cholesterol oxides. *J Sci Food Agric*, 1996, **71**: 22-26.

[5] Gorge AS, Daniel K. Transfer and expression of a *Streptomyces* cholesterol oxidase gene in *Streptococcus thermophilus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1992, **37**: 330-334.

[6] Smith M, Sullivan C, Goodman N. Reactivity of milk cholesterol with bacterial cholesterol oxidases. *J Agric Food Chem*, 1991, **39**: 2158-2162.

[7] Yazdia TM, Zahraeib M, Aghaepoura K, *et al.* Purification and partial characterization of a cholesterol oxidase from *Streptomyces fradiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2001, **28**(4): 410-414.

[8] Varma R, Nene S. Biosynthesis of cholesterol oxidase by *Streptomyces Lavendulae* NCIM 2421. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, **33**(2): 286-291.

[9] 王发合, 杨 辉, 朱 萍, 等. 胆固醇氧化酶高产菌类芽孢杆菌的诱变选育. 现代食品科技, 2006, **23**(3): 7-10.

[10] 桑 吉, 王龙刚, 李忠琴, 等. 胆固醇氧化酶高产菌株的复合诱变选育. 食品工业科技, 2006, **6**(27): 87-89.

[11] Wang YQ, Li QS. Natural Carotenoids Research, Production, Application. Beijing: China Medical Publishing House, 1997.

稿件书写规范

### 论文中统计学符号书写规则

统计学符号一般用斜体。本刊常用统计学符号介绍如下,希望作者参照执行:

样本的算术平均数用英文小写  $\bar{x}$ , 不用大写  $X$ , 也不用  $Mean$ 。标准差用英文小写  $s$ , 不用  $SD$ 。标准误用英文小写  $s_{\bar{x}}$ , 不用  $SE$ 。 $t$  检验用英文小写  $t$ 。 $F$  检验用英文大写  $F$ 。卡方检验用希腊小写  $\chi^2$ 。相关系数用英文小写  $r$ 。样本数用英文小写  $n$ 。概率用英文大写  $P$ 。