

酯酶产生菌株的分离筛选

覃拥灵^{1,2} 何海燕^{1,2} 李楠¹ 陈山岭¹ 梁智群^{1*}

(广西大学生命科学与技术学院 南宁 530004) (河池学院化学与生命科学系 宜州 546300)

摘要 利用溴甲酚紫染色法和发酵测酶活的方法,从土壤中筛选出一株酯酶高产菌株 ZM1。对 ZM1 进行形态特征及 5.8S rDNA 基因两侧的内转录间隙进行序列分析推测该菌株为灰绿犁头霉 (*Absidia glauca* Hagem)。经过紫外诱变处理,得到 1 株正突变株 ZMM1,在适合条件下,酶活达到 58.76U/mL,比出发菌株提高了 104.3%。传代实验表明 ZMM1 具有良好的遗传稳定性。

关键词 灰绿犁头霉,酯酶,筛选,鉴定,紫外诱变

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)03-0549-04

The Screening of Microorganism Producing Esterase

QIN Yong-Ling^{1,2} HE Hai-Yan^{1,2} LI Nan¹ CHEN Shan-Ling¹ LIANG Zhi-Qun^{1*}

(College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004)

(Department of Chemistry and Life Science, Hechi University, Yizhou 546300)

Abstract A strain named ZM1 capable of producing esterase had been isolated from soil samples by the methods of bromocresol purple staining technique and the determination of esterase value. The strain was identified as *Absidia glauca* Hagem based on its morphological characteristics and the sequence similarity of ribosomal DNA-ITS. A strain named ZZM1 was selected after UV mutagenesis. The results proved that ZMM1 had steady transmissibility when ZMM1 was cultivated at 32°C for 48h with 160r/min, the yields of esterase was 58.76U/mL, 104.3% higher than ZM1.

Key words *Absidia glauca* Hagem, Esterase, Screening, Identification, UV mutagenesis

酯酶(Esterase, EC3.1.1.1)是重要的工业酶类,水解酯类产生相应的酸和醇,在有机相中可以完成酯化、转酯、酯交换等反应,而且大多数反应具有不对称选择性,可以专一性制备用化学法难以合成的手性化合物,如液晶、光学活性药物及其前体,广泛应用于食品工业、医药行业、日用化工业、军事和生物防护等领域^[1-4]。

微生物种类繁多,生长周期短、易于分离和诱变、可工业化大规模培养,利用微生物发酵是工业化生产酯酶的良好途径。目前,国内外对于酯酶在生物转化方面的研究报道较少,获得高酶活的酯酶产生菌有广阔的应用前景。作者从含油土壤中筛

选出酯酶菌株,对其进行了形态特征、分子生物学鉴定,并利用紫外诱变选育到一株遗传性状稳定的酯酶高产菌株。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

BACKMANJ2-21 高速冷冻离心机(美国 Backman 公司);UV-1601 紫外分光光度计(日本 SHIMADZU 公司);320 pH Meter(Mettler toledo 公司);DNA Marker (TaKaRa 公司);PCR 纯化试剂盒(TaKaRa 公司);ITS 引物(大连宝生物工程公司合成);iCycler™ 型 PCR 仪(BIO-RAD);水平电泳仪(北京六一仪器公司);

* 通讯作者 Tel 0771-3270733, E-mail zqliang@gxu.edu.cn

收稿日期:2006-09-18,修回日期:2006-11-14

Gel Doc™ XR 型凝胶成相系统 (BIO-RAD)。

试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 土样

分别采集炼油厂、牛奶厂、肉联厂和食堂排污口等富含油脂环境的土样。

1.3 培养基

富集培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g, NaCl 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, KH_2PO_4 2g, 乙酸乙酯 25mL, 琼脂 20g, 定容 1L。初筛平板培养基: 酵母膏 10g, 溴甲酚紫 0.04g, 三醋酸甘油酯 30mL, 琼脂 20g, pH 值 7.0, 定容 1L。复筛培养基: 蔗糖 20g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5g, K_2HPO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, 酵母膏 10g, 定容 1L。PDA 培养基按文獻 [5] 配制。灭菌条件 0.1MPa 20min。

1.4 菌种筛选

1.4.1 初筛: 1g 土样溶于 10mL 无菌生理盐水, 振荡 5min, 制成悬浮液。稀释到一定倍数, 准确移取 0.1mL 稀释悬液涂布于富集培养基平板, 置于 32℃ 培养 3d。挑单菌落初筛平板划线分离, 直至分出纯菌株, 并转接到 PDA 斜面培养基。

1.4.2 复筛: 无菌状态下, 将 10mL 无菌水移入 PDA 斜面菌种制成孢子液。准确量取 1mL 孢子液转入复筛培养基中, 32℃、160r/min, 培养 48h, 发酵液 6000r/min 离心 10min, 分别收集菌体和上清液, 上清液 4℃ 保存备用;

菌体 6000r/min 离心 10min, 无菌生理盐水洗涤两次, 收集菌体。加入适量石英砂研磨破碎菌体, 用 pH6.3 PBS 缓冲液 4℃ 下浸提菌体 24h, 6000r/min 离心 10min, 收集菌体浸提液 4℃ 保存备用。

测定发酵上清液和菌体浸提液的酶活, 筛选出酯酶高产菌株, 确定菌株产酶部位。

1.5 发酵液酶活测定

参照禹邦超等多种形式酯酶总活力的混合底物分光光度测定法进行测定^[6]。

酶活力单位定义: 每小时生成 $1\mu\text{mol}\alpha\text{-NP}$ (α -萘酚) 为 1 个活力单位 (1U)。

1.6 菌种形态学观察

依据菌落形态特征, 菌丝的生长情况以及孢子的形状大小等特征做出初步鉴定。

1.7 总 DNA 的提取

参照 Michaelson 等总 DNA 的提取方法进行^[7]。

提取的总 DNA 用 70% (v/v) 乙醇洗涤沉淀 2 次, 晾干后溶于适量 TE (pH8.0), -20℃ 保存备用。

1.8 PCR 扩增

PCR 引物按 White 等报道设计^[8]。引物 ITS1 的序列为: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', 引物 ITS4 的序列为: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3', 由大连宝生物工程公司合成。PCR 扩增体系为: 2X GC buffer 12.5 μL , 2mmol/L dNTP 2.5 μL , 5 $\mu\text{mol/L}$ ITS1 引物 0.5 μL , 5 $\mu\text{mol/L}$ ITS4 引物 0.5 μL , 真菌总 DNA 2 μL , LA Taq 酶 0.3 μL , 加 ddH₂O 补足 25 μL 。反应条件为 94℃ 1min; 95℃ 20s, 55℃ 30s, 72℃ 1.5min, 30 个循环, 72℃ 5min。

1.9 序列测定和同源性比较

利用 TaKaRa 琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒回收 PCR 产物, 将 PCR 产物送上海基康生物技术公司测序, 利用 BLAST 软件对测序结果与 GenBank + EMBL + DDBJ + PDB 公布的已知的基因序列进行序列的同源性比对分析^[9,10]。

1.10 紫外诱变处理

紫外诱变条件及操作见文獻 [11], 照射时间分别为 0s、20s、40s、60s、80s、100s、120s、140s。以未经紫外线照射处理的菌悬液涂布平板作为对照组计算致死率, 以 UV 的照射时间为横坐标, 致死率为纵坐标, 做致死率曲线。

诱变突变株筛选: 以致死率达 90% 以上的照射时间为诱变剂量处理菌悬液并涂布平板, 避光培养 48h 后从筛选平板上选取黄色变色圈大的菌落取菌种一环接种至种子液培养基, 32℃, 160r/min 培养 24h, 按 10% 接种量把种子液接入发酵液, 32℃, 160r/min 培养 48h 后测酶活。

1.11 遗传稳定性实验

将筛选到的菌株接种于 PDA 培养基上传代, 每代都在相同的发酵培养条件下培养, 共传 8 代, 测定其酶活。

2 结果

2.1 菌种初筛和复筛

初筛平板培养基中的溴甲酚紫指示剂的变色范围为 pH 值 6.8 ~ 5.2, 颜色由紫 → 黄。酯酶把初筛平板培养基中的三醋酸甘油酯水解得到乙酸, 培养基 pH 值下降, 以溴甲酚紫指示剂黄色变色圈直

径和菌落直径之比作为酯酶产生菌的初筛依据。结果如图1和图2所示。

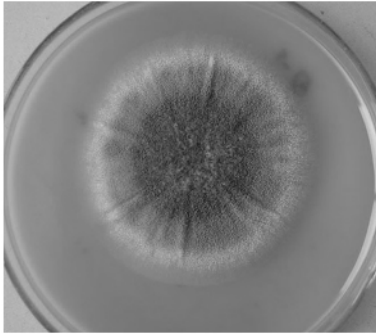


图1 ZM1在PDA培养基的菌落情况

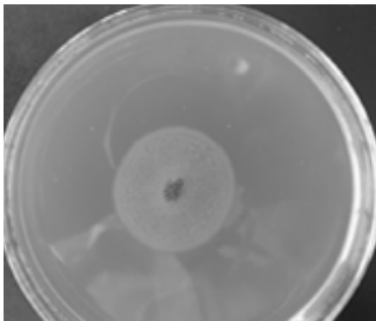


图2 ZM1在初筛培养基变色圈情况

初筛培养基分离筛选出12株产酯酶活力较高的菌株,编号为ZM1→ZM12。复筛实验表明,黄色变色圈直径和菌落直径之比值越大的菌种,发酵液酶活越高,添加有溴甲酚紫的初筛平板培养基以黄色变色圈直径和菌落直径之比作为初筛模型可以快速准确的筛选出产酯酶菌株。筛选到一株酯酶酶活较高的菌株ZM1,ZM1菌丝生长迅速,黄色变色圈直径和菌落直径之比值较大,酶活为28.76U/mL。初筛和复筛的实验结果见表1。以ZM1菌株作为出发菌株进行紫外诱变处理,选育高酶活的菌株。

摇瓶复筛实验只测到发酵上清液有酶活,胞体破碎浸泡液无酶活,判断该菌所产酯酶为胞外酶。

2.2 菌种鉴定

2.2.1 菌落形态特征:根据菌落形态特征及光学显微镜下观察孢子和子实体的形态,菌落在PDA培养基平板上呈浅蓝绿色,菌丝生长迅速,顶端膨大;孢子囊与中轴基合成卵形,囊轴为圆锥型;孢子表面光滑,较多,小圆形,成堆时为绿色。

2.2.2 菌株ITS位点的序列测定及其同源性比较:以ZM1的基因组DNA为模板,通过PCR扩增其ITS位点。扩增产物用1.2%的琼脂糖凝胶电泳,EB染

色后,紫外灯下切下约600bp的PCR扩增产物,试剂盒回收。PCR产物进行序列测定^[12]。

表1 菌种初筛和复筛结果

菌株	变色圈直径:菌体直径 (cm)	酶活 (U/mL)	菌丝生长情况
ZM1	3.86:1.62 = 2.38	28.76	++++
ZM2	3.52:1.70 = 2.07	26.24	++++
ZM3	3.48:1.72 = 2.02	26.12	++++
ZM4	3.32:1.65 = 2.01	25.66	+++
ZM5	2.92:1.58 = 1.85	23.32	+++
ZM6	2.75:1.49 = 1.84	22.78	+++
ZM7	2.72:1.48 = 1.83	21.45	+++
ZM8	2.66:1.47 = 1.81	21.03	+++
ZM9	2.54:1.45 = 1.75	20.11	+++
ZM10	2.47:1.42 = 1.74	19.22	++
ZM11	2.37:1.39 = 1.71	18.87	+++
ZM12	2.28:1.37 = 1.66	17.65	++

序列测定表明,ZM₁菌株ITS位点长591bp。利用BLAST软件与GenBank+EMBL+DDBJ+PDB中已知的基因序列进行序列的同源性比对分析,结果表明,ZM₁与报道的犁头霉菌(*Absidia glauca*)(GenBank号为AJ287135)具有极高的同源性,ITS位点有97%以上的同源性。依据菌株ITS位点的序列分析结果,结合菌落形态观察,菌落在马铃薯和酯酶选择初筛培养基平板上呈浅蓝绿色,推测ZM1菌株为灰绿犁头霉(*Absidia glauca* Hagem^[13])。

2.3 紫外诱变致死率曲线

随着紫外照射时间的延长,平板上的菌落数逐渐减少,即致死率逐渐增大,当时间达到100s时无菌落生长,其致死率为100%。时间为80s时,致死率为96.8%。紫外诱变的致死率曲线如图3所示。本实验取80s的照射时间进行紫外诱变。

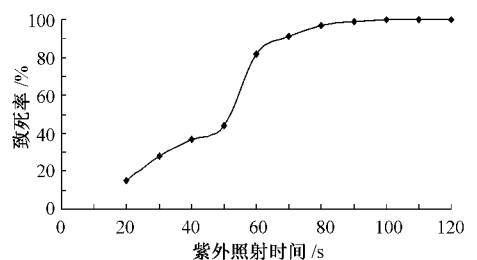


图3 紫外诱变致死率曲线

2.4 紫外诱变结果

实验结果表明,以酶活为 28.76U/mL 的 ZMM1 为出发菌株,经紫外诱变得得到 10 株正突变菌株,编号为 ZMM1-ZMM10,黄色变色圈直径扩大,黄色变色圈直径和菌落直径之比值也有所增加,菌丝生长速度更快,酶活提高,其中 ZMM1 酶活提高到 58.76U/mL,提高了 104.3%。结果见表 2。说明紫外诱变后 ZMM1 产酶酶活有明显提高,以 ZMM1 菌株作为实验菌株,进行遗传稳定性实验。

表 2 紫外诱变实验结果

菌株	变色圈直径:菌体直径 (cm)	酶活 (U/mL)	菌丝生长情况
ZMM1	5.68:1.94 = 2.92	58.76	+++++
ZMM2	5.18:1.96 = 2.64	51.25	+++++
ZMM3	5.06:1.94 = 2.61	49.34	+++++
ZMM4	5.02:1.93 = 2.60	48.96	+++++
ZMM5	4.97:1.92 = 2.59	47.36	++++
ZMM6	4.93:1.93 = 2.55	45.89	++++
ZMM7	4.87:1.91 = 2.54	42.12	++++
ZMM8	4.82:1.90 = 2.53	34.56	+++
ZMM9	4.81:1.92 = 2.51	33.57	+++
ZMM10	4.78:1.91 = 2.50	32.76	+++

2.5 紫外诱变遗传稳定性实验

ZMM1 菌株的酶活为 58.76U/mL,8 次传代后酶活为 57.47U/mL,为母代菌株酶活的 97.8%,代间酶活差异不大,证明 ZMM1 经紫外诱变后遗传性状稳定,结果见表 3。

表 3 紫外诱变正突变菌株遗传稳定性实验结果

传代	传代 1	传代 2	传代 3	传代 4	传代 5	传代 6	传代 7	传代 8
酶活 (%)	99.2	99	98.8	98.7	98.7	98.5	98.4	97.8

3 讨论

从含油土壤中取样,以酯类为唯一碳源,添加指示剂溴甲酚紫作为筛选平板,以筛选平板上指示

剂的黄色变色圈直径和菌落直径之比作为初筛依据,以多种形式酯酶总活力的混合底物分光光度测定法进行发酵液酶活测定复筛,该方法可以对发酵液酶活进行准确的微量分析,建立了一套酯酶产生菌快速准确的筛选模型。

分离筛选得到产酯酶的菌株 ZMM1,经形态特征、分子生物学鉴定为灰绿犁头霉(*Absidia glauca* Hagem)。经过紫外诱变,得到一株酶活达到 58.76U/mL 的酯酶高产菌株 ZMM1,遗传性状稳定,适合应用于酯酶的工业化生产。

今后研究重点应该放在灰绿犁头霉发酵生产酯酶培养条件的优化,菌种的分子定向改良以进一步提高其产酶量和酶活、酯酶的分离提取纯化方法上。

参考文献

- [1] 辛嘉英,李树本,徐毅,等.工业微生物,2000,30:31~34.
- [2] 徐诗伟,徐清,曹桂芳,等.微生物学报,1995,35:275~279.
- [3] 汤一新,孙志浩,华蕾,等.工业微生物,2001,3:1~5.
- [4] Bridges J W, Mackness M I, Chiphman J k, et al. *Comp Biochem Physiol*, 1986, 43:1254~1261.
- [5] 诸葛健,王正祥编.工业微生物实验技术手册.北京:中国轻工业出版社,1994,6:367.
- [6] 禹邦超,邓辉胜,王旭,等.华中师范大学学报(自然科学版),1996,30(1):87~91.
- [7] Louise V, Michaelson, Colin M, et al. *Biol Chem*, 1998, 273(30):19055~19059.
- [8] White T J, Bruns T, Lee S. Analysis of phylogenetic relationship by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA gene[A]. In: Innis M A, ed. *PCR protocol: A Guide to Methods and Application*. New York: Academic, 1990, pp.315~322.
- [9] 韦斯特海德 DR,帕里什 JH,特怀曼 RM 著.王明怡,杨益,吴平等译.生物信息学.北京:科学出版社,2004,9:61~65.
- [10] 武波,韦东,唐咸来,等.微生物学杂志,2001,21(2):3~5.
- [11] 沈萍,范秀容,李广武主编.微生物学实验(第三版).北京:高等教育出版社,1999,6:124~126.
- [12] Jongsik C, Anwarul H, Rita R, et al. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(5):2202~2208.
- [13] 魏景超.真菌鉴定手册.上海:上海科学技术出版社,1979,9:61~64.