

复合诱变提高节杆菌黄嘌呤氧化酶活力*

王 静, 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, 江苏无锡, 214122)

摘 要 以节杆菌(*Arthrobacter*) X7 为出发菌株, 经超声波联合亚硝基胍的复合诱变处理, 获得 1 株黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, 简称为 XOD)高产菌株 M3, 其酶活力达到 76.04 U/g(干菌体), 较出发菌株提高了 107%。通过优化实验对该菌株生产黄嘌呤氧化酶的营养要求和发酵条件进行了研究, 优化后, 该菌株的产酶活力达到了 273.24 U/g(干菌体), 每升发酵液总酶活力达到 724 U/L, 总酶活较诱变前提高了 7.33 倍。

关键词 黄嘌呤氧化酶, 节杆菌, 复合诱变, 发酵条件

黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XOD, EC1.1.3.22), 是一种氧化还原酶, 在嘌呤代谢途径起关键作用, 能催化黄嘌呤、次黄嘌呤生成尿酸。在医药和检测方面有着广泛的应用。例如, 提高病毒噬转化率^[1]、检测 SOD 的活力、测定血清无机磷的含量^[2]和检测鱼的鲜度^[3]等。目前国内外所使用的 XOD 主要是从牛奶中获取, 来源单一, 生产成本低, 而且 XOD 含量和质量受不同产地、不同种类奶牛的影响, 限制了其应用。自 1960 年代起, 国外已经开始致力于开发细菌来源的黄嘌呤转化酶, 但迄今为止仍存在许多诸如产酶菌种来源不多, 酶产量偏低, 纯化难度高, 基因与结构的研究不全面等问题。产 XOD 的微生物主要有细菌^[9]、链霉菌^[10]、假单胞菌^[10]。国内细菌发酵法产 XOD 仍停留在实验室阶段。通过诱变改良 XOD 产生菌, 使其产酶能力不断提高, 才有可能实现工业化生产。

江南大学工业生物技术教育部重点实验室于 2005 年分离获得 1 株产胞内 XOD 的节杆菌, 产酶水平为 8.81 U/g(干菌体), 经过氮离子束诱变处理, 突变株产酶水平达到了 36.67 U/g(干菌体)。为了进一步提高该菌 XOD 的生产水平, 采用超声波与亚硝基胍联合诱变处理^[6], 取得了明显的诱变效果, 突变株 M3 的产酶水平达到了 76.04 U/g(干菌体)。对突变株 M3 产酶条件进行优化, 发酵液 XOD 总酶活力达到了 724 U/L, 超过了国内曾报道水平。

1 材料和方法

1.1 菌种来源

第一作者: 硕士研究生(王武教授为通讯作者)。

* 工业生物技术教育部重点实验室基金项目(No. KLIB-KF200502)

收稿日期: 2007-10-25, 改回日期: 2007-12-20

菌株 *Arthrobacter* X7, 由江南大学工业生物技术教育部重点实验室选育和保藏。

1.2 主要试剂与仪器

黄嘌呤, 上海双向西巴斯科技发展有限公司; 辣根过氧化物酶, 上海双向西巴斯科技发展有限公司; 亚硝基胍(NTG), Fluka; 其它试剂均为分析纯试剂。

H66MC 型超声仪, 实验室自行设计并委托无锡超声设备公司制造; HP1100 高效液相色谱仪, C18, 200 mm, 5 μ m Agilent 公司高效液相色谱仪; TGL-16 型高速离心机, 上海医用仪器分析厂; CF702 高速冷冻离心机, 日本日立公司。

1.3 培养基

种子培养基(g/L): NaCl 5, 蛋白胨 10, 牛肉膏 5, 调 pH 值至 7.2。

发酵基本培养基(g/L): NaCl 5, (NH₄)₂SO₄ 2, 1%CaCl₂ 1 mL, MgSO₄ · 7H₂O 0.2, 葡萄糖 10, 酵母抽提物 1, 黄嘌呤(702 mmol/L) 2.5 mL, 调 pH 值至 8.0。

初筛培养基(g/L): KH₂PO₄ 6.8, K₂HPO₄ 8.7, MgSO₄ · 7H₂O 0.2, CaCl₂ 0.01, 酵母抽提物 0.1g, 黄嘌呤 1 g, 调 pH 值至 7.2。

1.4 测定方法

1.4.1 黄嘌呤氧化酶活力测定

黄嘌呤氧化酶活力的测定参照文献^[4]。此方法原理为: 黄嘌呤氧化酶在催化黄嘌呤氧化的反应过程中, 每氧化 1 mol 黄嘌呤, 将消耗 1 mol 分子氧和水, 产生 1 mol 尿酸和 1 mol H₂O₂。H₂O₂ 再经过氧化物酶作用分解, 可使 4-氨基安替比林与苯酚形成亚醌类呈红色的化合物, 其在 506 nm 下有最大吸收峰。在 506 nm 处测定该显色化合物的吸光度, 即可推算出 XOD 的酶活。

1.4.2 菌体量测定

菌体浓度用比色法($\lambda=600\text{ nm}$)和绝对干重法测定^[5]。

1.4.3 残糖测定

用3,5-二硝基水杨酸比色法测葡萄糖含量^[7]。

1.4.4 黄嘌呤测定

发酵液中黄嘌呤残留量的测定参照文献^[5]。

1.5 诱变方法

1.5.1 出发菌株的处理

出发菌株经完全培养基连续2次平皿活化,接种至液体完全培养基,培养至对数生长期,5 000 r/min,离心10 min,收集菌体,用pH6.0的磷酸钾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。

1.5.2 超声波结合亚硝基胍复合诱变处理

取出发菌悬液2 mL,置于无菌的5 mL塑料离心管内,处理条件:冰水浴,亚硝基胍浓度为1 mg/mL,超声200 W,50 kHz,超声间隙5次,每次处理5 min,其间停1 min。诱变结束后,采用8 000 r/min,离心10 min,收集菌体,并用pH7.8的Tris-HCl缓冲液稀释至原体积,振荡,同条件离心,反复重复3次,除去亚硝基胍。

1.5.3 高产菌株的筛选

诱变处理后的菌悬液,稀释至 10^{-6} 浓度,取0.2 mL涂布于筛选培养基,30℃、48 h培养,观察透明圈的大小,挑选透明圈较大的菌落进一步摇瓶复筛,选出产酶较高的突变菌株,发酵验证后,保藏及分析菌种。

1.6 发酵

接1环斜面培养基上的菌体于含50 mL种子培养基的250 mL三角瓶内,30℃、200 r/min培养24 h,再以8%接种量接于发酵培养基(500 mL三角瓶装液量100 mL),30℃、200 r/min摇瓶发酵。

2 结果与分析

2.1 诱变方案的确定

为选择较优的诱变方案,以致死率为指标,考察了超声波、亚硝基胍以及超声波联合亚硝基胍3种手段处理节杆菌的效果,其致死率随处理时间的变化曲线见图1。由此可见,3种诱变手段的致死率随时间延长而增大,其中复合诱变的强度最高。

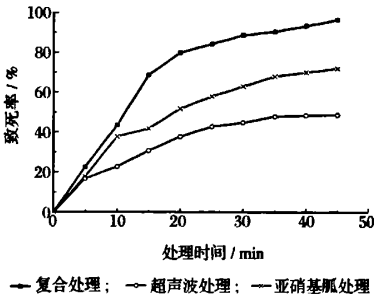


图1 不同处理造成的致死率比较

采用亚硝基胍和超声波联合处理(方法见1.2.6),以致死率为考察指标,复合诱变中超声波处理时间分别为5、10、15、20、25、30、35、40、45、50 min,实验结果见表1。当亚硝基胍浓度为1 mg/mL时,超声处理30 min,致死率为88.7%。故确定复合诱变的条件为亚硝基胍1 mg/mL,200W,50kHz超声强度,处理30 min。

表1 复合诱变致死率

超声处理时间/min	5	10	15	20	25	30	35	40	45
致死率/%	22.8	43.8	68.7	80	84.2	88.7	90.5	93.4	96.4

2.2 高产突变株的获得及遗传稳定性实验

由分离平板初筛挑选出透明圈相对较大的菌株200株,进行摇瓶发酵培养并检测其产酶量,表2中列

表2 发酵复筛结果

菌株编号	出发株	B2	C5	F8	L6	M3	M8	O3	S2
菌体量/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	3.19	3.09	2.76	2.61	2.88	2.69	3.25	2.05	1.90
酶活/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	117.05	123.12	133.59	111.61	137.18	204.85	129.77	123.27	98.61
比产酶率/ $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ (干菌体)	36.67	39.87	48.42	42.73	47.65	76.04	39.88	60.25	51.98
比产酶提高率/%	—	8.73	32.04	16.52	29.94	107.36	8.75	64.30	41.75

表3 菌株M3的遗传稳定性

菌株编号	菌体量/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	比产酶率/ $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ (干菌体)	总酶活	相对酶活/%
M3-1	2.69	75.96	204.64	100
M3-2	2.51	76.72	192.49	94.06
M3-4	2.71	75.27	205.27	100.31
M3-6	2.70	75.66	204.21	99.79
M3-10	2.68	76.05	203.66	99.52

出部分产酶量提高较明显的菌株。

从表2可以看出,突变菌株产酶水平均有很大提高,其中M3菌株产酶活力最高,产酶活力增加了75.01%,比产酶率提高了107%。

M3菌株的遗传稳定性实验:将突变株M3连续10次斜面转接活化,分别取转接1、2、4、6、10次的斜

面培养基上的菌体,摇瓶发酵,进行产酶能力的考察,结果如表3所示。突变株 M3 的遗传性状比较稳定,同时也进一步证明了利用超声波与亚硝基胍复合诱变育种的可行性。

2.3 诱变菌株产酶条件的优化

2.3.1 培养温度对产酶的影响

考察不同培养温度对活化后的菌株 M3 产 XOD 的影响。如图2所示,培养温度为 30℃ 时,菌株 M3 生长最好,产酶最高,达到 75.8 U/g(干菌体)。此性质与诱变前的出发菌株的相同。

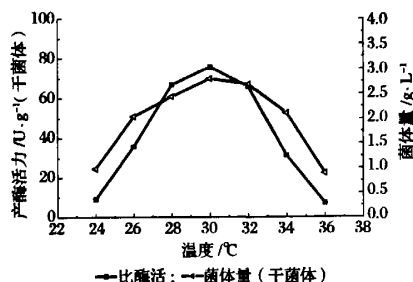


图2 培养温度对菌株 M3 产酶的影响

2.3.2 起始 pH 值对产酶的影响

用 HCl 和 NaOH 溶液调节培养基的起始 pH 值,接种于优化后的发酵培养基中于 30℃ 培养 24 h 左右,结果见图3。培养基的最适起始 pH 范围为 9.0~10.0,酸性条件对产酶和菌体生长不利。与出发菌株起始 pH 相比偏碱的原因可能是:一方面复合诱变可能提高了菌体的耐碱能力;另一方面诱导底物黄嘌呤是碱溶性的,培养基初始 pH 偏碱,有利于黄嘌呤的溶解和菌体的吸收,从而提高产酶量。

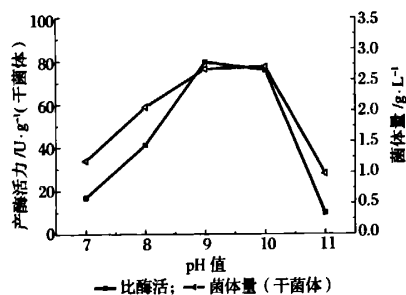


图3 初始 pH 值对菌株 M3 产酶的影响

2.3.3 接种量对产酶的影响

以不同的接种量培养菌株 M3,发酵培养 24 h 后测定酶活和菌体量,结果如图4所示。当接种量为 10% 时,突变株 M3 产酶量最高。接种量大于 10% 以后,产酶活力随接种量的增大急剧下降。

2.3.4 不同碳源对产酶的影响

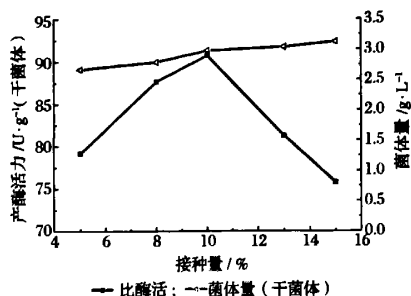


图4 接种量对菌株 M3 产酶的影响

在发酵基本培养基的基础上,采用不同的碳源按不同的浓度配制培养基对诱变株 M3 进行发酵试验,以含相应浓度的葡萄糖为对照,于 30℃ 静置培养 24 h,测定产酶活力。从图5结果可知,葡萄糖或麦芽糖为碳源时,菌株 M3 的产酶活力相对较高,其中以 15.0 g/L 葡萄糖为碳源时,产酶活力达到 95.6 U/g 干菌体。因此确定葡萄糖是产酶较为适宜的碳源,最适浓度为 15.0 g/L。

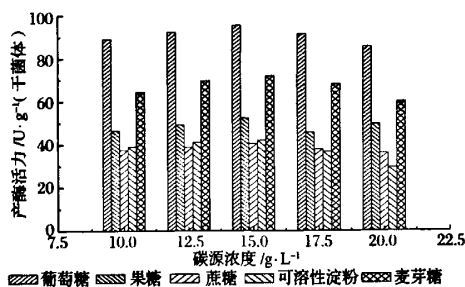


图5 碳源对产酶的影响

2.3.5 不同氮源对产酶的影响

在发酵基本培养基的基础上,采用不同的氮源按不同的浓度配制培养基对诱变株 M3 进行发酵试验,以含相应浓度的硫酸铵为对照,于 30℃ 静置培养 24 h,测定产酶活力,结果如图6所示。酵母膏是产酶较为适宜的氮源,当浓度为 5 g/L 时,菌株 M3 产酶活力最高,达到 114.2 U/g(干菌体)。

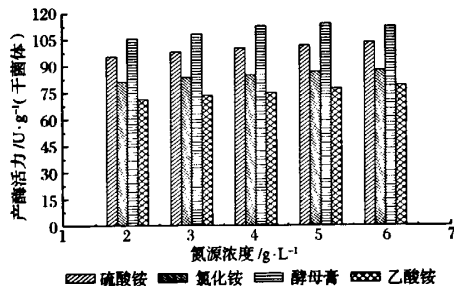


图6 氮源对产酶的影响

2.3.6 黄嘌呤浓度对产酶的影响

向发酵培养基中添加不同浓度的黄嘌呤,培养24 h后,分别测定XOD产酶活力以及发酵液中的黄嘌呤残留量,求出相应的利用率。结果表明(图7),黄嘌呤浓度在0.25~2 g/L时随着黄嘌呤浓度的增加,产酶活力逐渐增加;当黄嘌呤浓度大于2 g/L时,产酶活力随黄嘌呤浓度的增加而降低。图7中显示黄嘌呤的利用率是随着黄嘌呤的添加浓度的增加而下降。

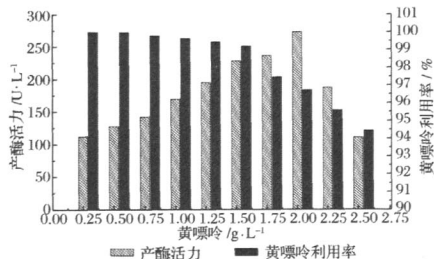


图7 不同黄嘌呤浓度对菌株M3产酶的影响

节杆菌所产的XOD是诱导酶^[11],提高黄嘌呤的浓度可以诱导菌体产更多的XOD,但当黄嘌呤浓度大于2 g/L,会产生底物抑制,使菌体产酶活力下降。黄嘌呤在水中的溶解度不大,若将其添加量加大,发酵液中会出现部分沉淀,不利于菌体利用,因而黄嘌呤利用率随其添加浓度增加而下降。从图7可知,最适黄嘌呤浓度为2 g/L。

2.3.7 优化后菌株M3产酶过程曲线

采用最佳培养基和最佳培养条件,即培养温度30℃起始pH值9.0的条件下进行产酶试验,定时取样,测定菌体量、产酶活力、总酶活及黄嘌呤残留量,结果见图8。

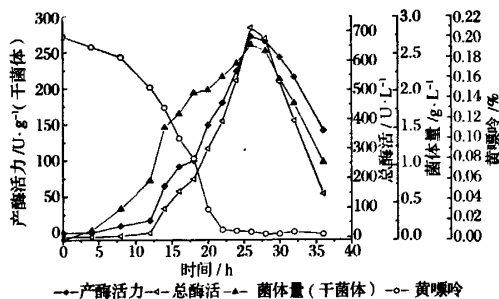


图8 菌株M3发酵过程曲线

由图8可知,产酶与细胞生长基本同步,说明细菌产酶与细胞生长是一个相互偶联的过程。当培养时间为26 h,即对数生长期末期时,产酶活力为274.84 U/g(干菌体),菌体量为2.62 g(干菌体)/L,两者均达到最大值。26 h之后,菌体已基本停止生

长,产酶能力也有所下降。因此,产酶的最佳时间为26 h。

3 结论

超声波具有很强的生物学效应,其机理很复杂,主要就是空化作用,是指在超声波作用下,存在于液体中的微小气泡(汽泡或空穴)所发生的一系列动力学过程:振荡、扩大、收缩乃至崩溃^[12]。空化泡绝热收缩至崩溃瞬间,泡内可呈现5 000℃以上的高温和几千个大气压,并伴有强大的冲击波或射流等,这足可以改变细胞的壁膜结构,使细胞内外发生物质交换,甚至是发生突变^[13]。

用超声波联合NTG处理,能够促进NTG进入到菌体细胞内,另外,超声波的振荡作用能够促进菌体DNA双链的解旋,促进NTG直接作用于DNA复制系统,诱发变异。本实验将超声波与亚硝基胍2种传统的诱变手段结合起来,同时处理出发菌株,以黄嘌呤为限制性碳源筛选,取得了较好的诱变效果。通过1 mg/mL亚硝基胍和超声(200 W, 50 kHz, 30 min)同时处理细胞悬液,获得1株产酶活力提高107%的突变株,突变株的产酶活力从36.67 U/g(干菌体)提高到76.04 U/g(干菌体)。同时经过多次发酵检验,突变菌株性状较稳定,没有产生明显的回复突变现象。结果证明这种复合诱变方法在节杆菌的诱变育种中取得了较好的诱变效果。

分批优化结果表明,葡萄糖和酵母膏是产酶适宜碳源和氮源,黄嘌呤适宜添加量为2 g/L。经培养条件的优化后,确定了产酶最适温度为30℃,最适起始pH值在9.0~10.0,发酵时间为26 h左右,菌株M3产酶能力进一步提高到273.24 U/g(干菌体),发酵液XOD总酶活达到了724 U/L,超过了国内曾报道的水平^[5,8],比优化培养基前菌体产酶活力提高了2.59倍,每升发酵液的总酶活较诱变前提高了7.33倍。上述结果对工业化利用节杆菌发酵XOD具有一定的指导作用。

要实现工业化生产细菌黄嘌呤氧化酶制剂,必须进一步提高该菌株的产酶活力和发酵液菌体浓度。一般,高产的工业菌种都是经过多次诱变选育而得,对菌株进行多方位改造,强化优良性状,去除不良性质或增加新的性状。变异株*Arthrobacter* M3是本实验室从自然界中筛选得到野生菌株后,只经过2轮诱变而得。因而,选择合适的诱变手段,还有进一步提高*Arthrobacter* M3产酶能力的潜力。另外,要实

现工业化生产 XOD, 还应该解决高密度培养发酵的问题, 该菌株的发酵条件和营养需求等方面的限制性的因素有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 孟疆辉, 陈蔚梅. 利用黄嘌呤氧化酶提高病毒唑转化率[J]. 武汉大学学报(自然科学版), 1999, 45(6): 838~840
- 2 方北曙, 李翠莲, 黄中培. 牛乳中黄嘌呤氧化酶研究综述[J]. 食品与机械, 2006, 22(1): 93~96
- 3 罗颖华, 王立红. 黄嘌呤氧化酶电极的研制和鱼的鲜度测定[J]. 化学传感器, 1990, 10(2): 35~40
- 4 李忠琴, 许小平, 王 武. 辣根过氧化物酶分光光度法测定黄嘌呤氧化酶的活性[J]. 分析化学, 2006, 34(6): 821~824
- 5 夏小花, 杨海麟, 王 武. 产黄嘌呤氧化酶节杆菌 X7 产酶条件优化[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2007, 28(2): 51~54
- 6 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[J]. 食品工业科技, 2006, 27(6): 87~89
- 7 宁正祥. 食品成分分析手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1989. 9
- 8 易福明, 吴显辉. 黄嘌呤氧化酶产生菌的离子注入诱变及其二步发酵的研究[J]. 激光生物学报, 2002, 11(2): 138~141
- 9 Shabtay Disktein, Felix Bergmann, Yigal Henis. Studies on uric acid and related compounds IV. the specificity of bacterial xanthine oxidases [J]. Transaminase Mechanism, 1956, (5): 67~77
- 10 Woolfork C A. Metabolism of N-Methylpurines by a *Pseudomonas putida* Strain Isolated by Enrichment on Caffeine as the Sole Source of Carbon and Nitrogen [J]. Journal of Bacteriology, 1975, 123(3): 1 088~1 106
- 11 Woolfolk C A, Downard J S. Distribution of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase specificity types among bacteriology [J]. Journal of Bacteriology, 1977, 130(3): 1 175~1 191
- 12 杨胜利, 王金宇, 杨海麟, 等. 超声波对红曲菌的诱变筛选及发酵过程在线处理[J]. 微生物学通报, 2004, 31(1): 45~49
- 13 王 武, 杨海麟, 吕震付, 等. 超声波在生物发酵工程中的应用[J]. 无锡轻工大学学报, 2006, 21(3): 322~326

Improvement of *Arthrobacter* Xanthine Oxidase (XOD) Production by Dual-mutation

Wang Jing, Sun Yan, Yang Hailin, Wang Wu

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

ABSTRACT M3, a high xanthine oxidase (for short, XOD) producer mutant, was screened from *Arthrobacter* X7 by ultrasonic and NTG treatment. The enzyme activity of M3 was 76.04 U/g (dry weight), which increased 107% in comparison with the parent strain. The optimum medium and fermentation conditions were optimized by single factor experiments. After optimization, the result showed that the enzyme activity of M3 reached to 273.24 U/g (dry weight), and one liter fermentation liquid contained 724 U xanthine oxidase, 7.33 times as the parent strain.

Key words xanthine oxidase, *Arthrobacter*, dual-mutation, fermentation condition

行业
动态

我国反渗透番茄酱生产线落户内蒙古

RO(Reversal Osmotic, 反渗透)番茄酱是世界番茄酱中的高端产品, 价格比普通番茄酱高出 40% 左右。迄今为止, 全世界仅 5 套此类产品的生产设备, 我国唯一一套从日本进口的 RO 番茄酱生产设备已落户内蒙古巴彦淖尔市。

RO 番茄酱的生产工艺不是利用传统的高温、真空浓缩番茄汁, 经热力杀菌灌装至无菌铝箔袋, 而是通过反渗透原理, 直接将压榨番茄汁中的水分分离, 所制成的番茄酱采用无菌冷灌装技术, -18~-22℃ 低温冷冻保存。RO 番茄酱采用最先进的番茄酱生产技术, 尽可能地保持了鲜番茄的原味, 为番茄制品提供了更广泛的空间。