

节杆菌 82 菌株胆固醇氧化酶的产生条件

苏起恒 法幼华

(中国科学院微生物研究所, 北京)

节杆菌 82 菌株不需胆固醇诱导即可产生大量胞外胆固醇氧化酶。本文比较了该菌株在不同碳源、氮源及不同葡萄糖或玉米浆浓度下的产酶情况。发现该菌株在含较丰富的有机氮培养基中生长三天, 产酶活力可超过 600 u/L。可提取到分泌至胞外的酶活力占总酶活力的 60%。除去上清液的细胞, 经 Triton X-100 处理后可提出的胞内胆固醇氧化酶活力约占总酶活力的 10%。考查了在不同培养条件下, 细胞中胆固醇氧化酶渗出率的变化。

关键词 节杆菌 82 菌株; 胆固醇氧化酶

Turfitt^[1] 发现红平原放线菌 (*Proactinomyces erythropilis*) 降解胆固醇的第一个产物是胆甾-4-烯-3-酮 (Cholest-4-en-3-one)。Sih^[2] 用局限诺卡氏菌 (*Nocardia restrictus*) ATCC 14887 转化胆固醇, 早期产物也是胆甾-4-烯-3-酮, 随后再经过一系列代谢, 最后形成 CO₂ 和 H₂O。分枝杆菌 (*Mycobacterium*)、假单胞杆菌 (*Pseudomonas*) 和节杆菌 (*Arthrobacter*) 也都产生同样的反应^[3-5]。Talalay 和 Dobson^[6] 曾对引起这一反应的酶进行初步研究。Richmond^[6] 从诺卡氏菌 NCIB 10554 的细胞中分离到胆固醇氧化酶, 并建立了用此酶作为测定血清胆固醇的酶学方法。Buckland 及其合作者^[7-8] 又用这株菌摸索了大规模生产此酶的方法及条件, 并进行了产酶的动力学研究。用胆固醇氧化酶测定胆固醇的酶学方法, 专一性强, 简便而准确, 适用于生化分析仪和人工操作^[9-11]。

前文^[12]曾报道一株能在营养培养液中产生大量胞外胆固醇氧化酶的节杆菌 82 菌株 (*Arthrobacter* 82) 和该菌株所产胆固醇氧化酶的性质。本文主要对该菌株的产酶条件进行研究。

材料和方法

(一) 微生物

节杆菌 82 菌株。

(二) 菌培养及产酶条件

将在牛肉汁斜面上生长二天的培养物接种到摇瓶培养基中。其组成(%): 葡萄糖 1, 玉米浆 4, KH₂PO₄ 0.1, 自来水配制, pH 7.2。每个 250ml 摇瓶装 40ml 培养基, 0.55kg/cm² 灭菌 30 分钟, 于 30℃ 振荡培养。种液培养 24 小时, 产酶试验和二级培养 72 小时。培养后的菌液直接作为测定胆固醇氧化酶总酶活性的酶液。菌液经离心(每分钟 1000 转, 30 分钟), 上清液作为测定胞外胆固醇氧化酶活性的酶液。收获的细胞用蒸馏水洗涤一次后, 加含 0.05% Triton X-100 的 0.05 mol/L (pH 7.6) 磷酸缓冲液至原体积, 在 30℃ 水浴中振荡 30 分钟, 再离心, 取上清液作为测定胞内胆固醇氧化酶活性的酶液。

(三) 胆固醇氧化酶活力的测定

采用改进的 Richmond^[6] 方法, 分别测定菌液, 胞外及胞内各部分酶液的胆固

本文于 1990 年 5 月 30 日收到。

醇氧化酶活性, 根据在 37℃ 每分钟转化 1mol 的胆固醇为胆甾-4-烯-3-酮的酶量为一个胆固醇氧化酶活性单位 (u)。

(四) 菌生长的测定

菌液用蒸馏水稀释 10 倍, 在 620 nm 波长处测定其光密度值, 以 OD 值表示相对生长量。

(五) 甾体化合物

胆固醇为分析纯, 上海市食品公司制药厂产品; 胆甾-4-烯-3-酮为本试验室用节杆菌 82 菌株转化胆固醇后所得的产物。

实验结果

(一) 节杆菌 82 菌株的产酶情况

节杆菌 82 菌株在普通营养培养液中可产生大量胆固醇氧化酶, 而且大部分分泌到胞外。除去上清液的细胞经含 Triton X-100 的磷酸缓冲液处理后, 可提取到一定量的胞内胆固醇氧化酶。表 1 是该菌在培养 72 小时后, 菌液和上清液及细胞各部份酶液中的酶活力以及分别占总酶活力的百分数。

表 1 节杆菌 82 的产酶情况

Table 1 Enzyme production of *Arthrobacter* 82

次 数 No.	酶 活 力 Enzyme activity					
	总酶活力 Total activity		胞外酶 Exoenzyme		胞内酶 Endoenzyme	
	(u/L)	(%)	(u/L)	(%)	(u/L)	(%)
1	562	100	335	59.6	63	11.2
2	615	100	351	57.1	69	11.2
3	578	100	351	60.7	76	13.1

表 2 胆固醇对产酶的影响

Table 2 Effect of cholesterol on enzyme production

条 件 Condition	OD ₆₂₀	相对酶活力 Relative activity (%)
葡萄糖 Glucose (1%)	1.00	100
胆固醇 Cholesterol (3%)	1.15	50
胆固醇后期加 Cholesterol added in later stage (0.1%)	0.97	74

(二) 胆固醇对产酶的影响

用 3% 胆固醇代替葡萄糖培养节杆菌 82 菌株, 发现该菌生长旺盛, 但产酶活力却下降 50%, 表 2 的结果还表明, 在葡萄糖为碳源的培养基中生长后期加入 0.1% 胆固醇, 也影响其产酶活力。

(三) 不同碳源对产酶的影响

用不同碳源, 按 1% (W/V) 的量配制培养基。该菌在这些培养基内生长 72 小时后, 分别测定酶活力。表 3 的结果说明各种碳源都可用于菌的生长和产酶, 蔗糖是最适的碳源。

(四) 葡萄糖浓度对产酶的影响

图 1 的结果表明, 葡萄糖的浓度在 1%

表 3 各种碳源对产酶的影响

Table 3 Effect of various carbohydrates on enzyme production

碳源 Carbohydrate	相对酶活力 Relative activity*(%)
葡萄糖 Glucose	100
麦芽糖 Maltose	93
半乳糖 Galactose	85
果糖 Fructose	74
甘油 Glycerine	87
蔗糖 Saccharose	117
可溶性淀粉 Soluble starch	96

* OD₆₂₀ = 1.15

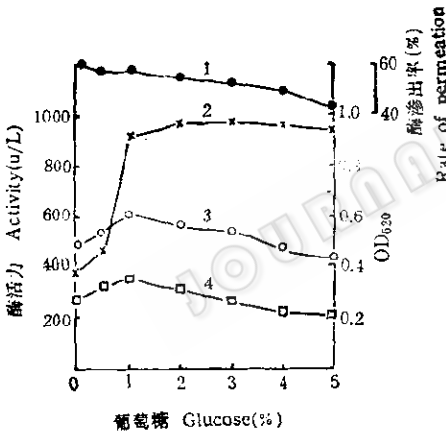


图 1 葡萄糖浓度对生长、产酶及酶渗出率的影响
Fig. 1 Effect of glucose concentration on cell growth, enzyme production and ratio of enzyme permeation

- 1. 酶渗出率 Rate of enzyme permeation(%);
- 2. 菌生长 Cell growth;
- 3. 总酶 Total enzyme;
- 4. 胞外酶 Exoenzyme

以下,酶活力随糖浓度的增加而提高。虽在含2%糖的培养基中生长得更好些,但糖浓度超过1%,对产酶有明显抑制作用。从所测定的结果分析,高浓度的葡萄糖不但抑制酶的产生,而且对酶渗出胞外也不利,

酶的渗出率随糖浓度的增加而降低。

(五) 不同氮源对产酶的影响

用不同种类的氮源取代培养基中的玉米浆,添加浓度均为 C/N = 7.35(蛋白胨、酵母膏和玉米浆为 0.5% W/V),初始 pH 7.2,培养 72 小时后测酶活力,从表 4 可以看出以有机氮为氮源,产酶活力明显高。

表 4 各种氮源对产酶的影响

Table 4 Effect of various nitrogen sources on enzyme production

氮源 Nitrogen (%)	相对酶活力 Relative activity*(%)
NH ₄ Cl	69
(NH ₄)NO	51
NaNO ₃	98
(NH ₄) ₂ CO	49
蛋白胨 Peptone	130
酵母膏 Yeast extract	131
玉米浆 Corn steep liquor	100

* OD₆₂₀ = 0.51

(六) 玉米浆浓度对产酶的影响

考虑到玉米浆来源丰富、价格低廉、利于工业生产应用。为此测定了不同浓度玉米浆对菌生长及产酶的影响。图 2 的结果表明,菌体的生长及产酶均随玉米浆浓度的增加而提高,但玉米浆浓度对酶的渗出率影响不大。

(七) 通气量对产酶的影响

分别在 250 ml 摇瓶中装不同量的培养基 (20—100ml),接种量按体积比均为 5%,培养后测定结果发现,在本试验条件下,通气量不影响菌的生长,对产酶有一定影响,通气量充足,产酶活力高些。

(八) 培养过程中胆固醇氧化酶的产生情况

于培养不同时间取样测定菌的生长 pH 及各部分酶液的酶活力,结果见图 3。

在 72 小时的培养过程中,菌的生长持续上升,pH 从 7.0 上升到 8.0,随着时间的延长,产酶活力也不断增加,最终达 621u/L。胞外酶液的酶活力为 362 u/L, 占总酶活力

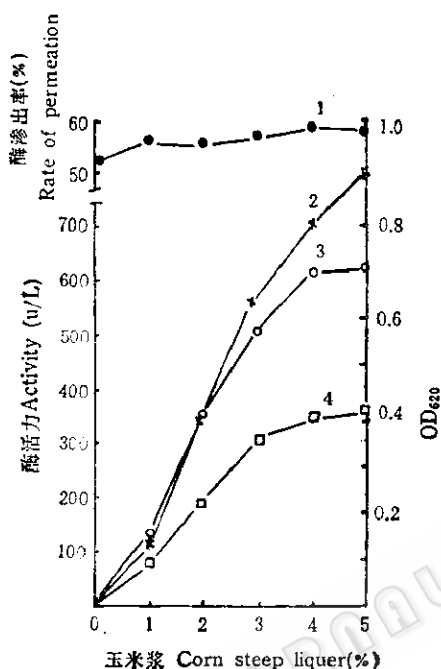


图2 玉米浆浓度对生长、产酶及酶渗出率的影响
Fig. 2 Effect of corn steep liquor concentration on cell growth, enzyme production and ratio of enzyme permeation

1. 酶渗出率 Rate of enzyme permeation(%);
2. 菌生长 Cell growth;
3. 总酶 Total enzyme;
4. 胞外酶 Exoenzyme

的 58.2%。胞内酶液的酶活力为 59u/L, 占总酶活力的 9.5%。这两部分共获 67.7% 的酶活力, 这说明还有 30% 以上的酶活力在处理过程中受损。最活跃的产酶期在 36 小时内, 这期间产酶量为最终产酶量的 89% 尤其在 12 小时以内, 酶的产生非常迅速。培养时间不同并不影响酶渗出胞外的比例, 但随着培养时间延长, 可被提出的胞内酶量逐渐增加。

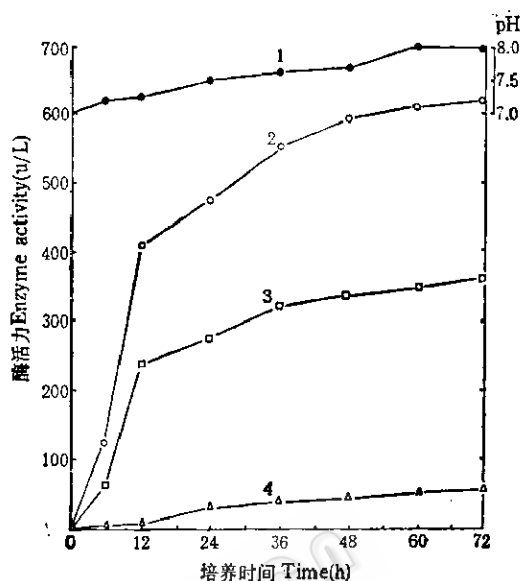


图3 节杆菌 82 菌株产胆固醇氧化酶的过程
Fig. 3 Production process of cholesterol oxidase by Arthrobacter 82

1. pH; 2. 总酶 Total enzyme; 3. 胞外酶 Exoenzyme; 4. 胞内酶 Endoenzyme

讨 论

节杆菌 82 菌株所产生的胆固醇氧化酶约有 60% 分泌到胞外, 因而不需经过处理就可直接从离心后的上清液中得到, 这对大规模工业生产极为有利。另外从产酶条件试验的结果中可以看出, 该菌在普通的营养培养基中就可产生大量胆固醇氧化酶, 不需胆固醇的诱导。不论在生长初期或后期加入胆固醇都会降低产酶活力, 这与 Buckland 等^[8]、刘文雄和陈启祥^[13]以及 Wilmanska 和 Sedlaczek^[14]的结果不一致。有关节杆菌 82 菌株的这一生理特性, 尚需进一步研究。用该菌生产的胆固醇氧化酶, 已在制备胆固醇试剂盒生产中应用, 产品性能稳定, 质量达国际水平^[15]。

参 考 文 献

- [1] Turfitt, G. E.: *Biochem. J.*, **38**: 492—496,

- 1944.
- [2] Sih, C. J.: *Biochem. Biophys. Acta*, **62**: 541—547, 1962.
- [3] Statman, T. C. et al.: *J. Biol. Chem.*, **205**: 823—837, 1954.
- [4] Talatay, P. and M. M. Dobson: *J. Biol. Chem.*, **205**: 823—837, 1953.
- [5] Arima, K. M. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **33**: 1636—1643, 1969.
- [6] Richmond, W.: *Clin. Chem.*, **19**: 1350—1356, 1973.
- [7] Buckland, B. C. et al.: *Industrial Aspects of Biochemistry*, p. 65—79, (ed. B. Spencer) Fed. Europ. Biochem. Soc., Amsterdam, 1974.
- [8] Buckland, B. C.: *Biotechnol. Bioeng.*, **18**: 601—621, 1976.
- [9] Allain, C. C. et al.: *Clin. Chem.*, **20**: 470—475, 1974.
- [10] Smith, A. G. and G. J. W. Brooks: *J. Steroid Biochem.*, **7**: 705—713, 1976.
- [11] Guilbaur, G. G.: *Handbook of Enzymatic Methods of Analysis*, p. 233—235, Marcel Dekker INC. New York and Basel, 1976.
- [12] 法幼华、苏起恒: *微生物学报*, **24**: 294, 1984.
- [13] 刘文雄、陈启祥: *中华农化杂志 (台湾)*, **18**: 1—11, 1984.
- [14] Wilmanska, D. and L. Sedlacek: *Acta Microbiologica, Polonica*, **17**: 45—51, 1988.
- [15] 中国科学报, 1991年5月17日.

PRODUCING CONDITION OF CHOLESTEROL OXIDASE OF *ARTHROBACTER* 82

Su Qiheng Fa Youhua

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

A strain of *Arthrobacter* 82 with the high potency in production of exocellular cholesterol oxidase was compared for the enzyme production with a variety of carbonic and nitric sources. It was found that more than 600 u/L cholesterol oxidase was produced by *Arthrobacter* 82 grown in a plentiful of organic nitrogenous medium within three days cultivation. About 60% of the enzyme was shown to be

secreted out to the supernatant of culture broth, and 10% additional enzymatic activity could be detected in the cell which was treated by triton X-100. The permeation rate of cholesterol oxidase from the cells grown under some different conditions were investigated.

Key words

Arthrobacter 82; Cholesterol oxidase