

产顺式环氧琥珀酸水解酶的红球菌 M1 菌株的 分离鉴定及其产酶条件优化

潘克侠 闵航* 夏颖 徐晓宇 阮爱东

(浙江大学生命科学学院 杭州 310029)

摘 要 从土壤中筛选到一株产顺式环氧琥珀酸水解酶(ESH)的菌株,经生理生化、Biolog 碳源利用试验和 16S rDNA 序列分析系统发育研究,菌株可能为赤红球菌(*Rhodococcus ruber*) M1。摇瓶试验确定了最佳碳源、氮源、顺式环氧琥珀酸二钠添加时间和添加量。正交优化试验的最佳培养基和培养时间为:葡萄糖 1.2%,硫酸铵 0.6%,酵母膏 0.5%,顺式环氧琥珀酸二钠投加时间为 30h,投加量为 3.58%,菌体培养时间 70h。摇瓶试验 ESH 酶活达 750U/g 湿细胞。目前该菌株已经应用于固定化细胞连续生产 L(+)酒石酸。

关键词 红球菌,顺式环氧琥珀酸水解酶,序列发育分析,发酵,L(+)酒石酸

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2004)03-0276-05

L(+)酒石酸是一种在食品、饮料业、医药和化工行业有着广泛用途的有机酸,自上世纪 70 年代左藤英次等^[1]报道用酶法转化生产或其产生菌生产 L(+)酒石酸以来,国内外学者进行了较多报道。张建国等^[2]筛选到棒状杆菌(*Corynebacterium*)并进行了添加前体发酵生产 L(+)酒石酸的研究,孙志浩等^[3]筛选到诺卡氏菌(*Nocardia*)并进行了 L(+)酒石酸生产的放大研究。

本文筛选到一株产顺式环氧琥珀酸水解酶(*cis*-epoxysuccinate hydrolase,ESH)的菌株,经 BIOLOG-GP 鉴定、(G+C)mol% 含量的测定和基于 16S rDNA 序列的系统发育研究鉴定该菌株可能为赤红球菌(*Rhodococcus ruber*) M1,并进行了该菌株的放大生产,转化率和产酸均具较高水平。目前国内外尚未见到有关红球菌在酒石酸生产中的研究报道。

1 材料和方法

1.1 菌株

菌株从浙江大学华家池校区田园土中分离获得。取土 1kg,加 pH 8.0 1mol/L 的顺式环氧琥珀酸二钠 0.5 L 搅匀后,30℃ 放置 30d。取土 5g 加无菌水 5mL,然后取土壤悬浮液 1mL 稀释 10⁵ 倍,于选择性平板上划线,30℃ 放置 7d。挑取多个单菌落,经发酵性检验选取酶活最高的 P1 菌株在选择性培养

基中再连续摇瓶驯化 5 代,每一代在选择性平板上划线并挑取单菌落经发酵检验,最后选取酶活最高的菌株 M1 进行后续研究。

1.2 培养基和培养条件

选择性培养基:每升含顺式环氧琥珀酸二钠 20.0g,磷酸氢二钾 2.0g,磷酸二氢钾 2.0g,硫酸铵 6.0g,七水硫酸镁 0.5g,七水硫酸亚铁 0.03g,琼脂 20g。**斜面培养基:**每升含葡萄糖 15.0g,蛋白胨 6.0g,酵母膏 3.0g,氯化钠 5.0g,顺式环氧琥珀酸二钠 5.0g,琼脂 2.0g,pH 7.0。**种子培养基:**每升含葡萄糖 15.0g,蛋白胨 6.0g,酵母膏 3.0g,硫酸铵 3.0g,氯化钠 5.0g,顺式环氧琥珀酸二钠 5.0g,pH 7.0。**发酵培养基:**每升含葡萄糖 12.0g,硫酸铵 6.0g,酵母膏 0.5g,顺式环氧琥珀酸二钠 7.0g,磷酸氢二钾 2.0g,磷酸二氢钾 2.0g,七水硫酸镁 0.6g,七水硫酸亚铁 0.02g,pH 7.0。

培养温度 30℃ ± 1℃,150r/min。

1.3 试剂

顺式环氧琥珀酸二钠的合成参照 Payne 等的方法^[4]由本试验室合成,其它试剂均为 A.R. 级。

1.4 菌株 M1 的分类鉴定

1.4.1 形态学特征:将菌株 24h 培养物用 2.5% 戊二醛固定 2h,以 0.1mol/L 磷酸缓冲液漂洗 3 次,每次 15min,然后钨酸固定 2h,再用 50% ~ 100% 乙醇

基金项目 浙江省横向课题

作者简介 潘克侠(1977 -),男,山东莘县人,硕士生,从事应用微生物研究。

* 通讯作者。Tel 86-571-86971287,E-mail: minhang@zju.edu.cn

收稿日期 2003-07-08,修回日期 2003-10-18

梯度脱水,乙酸异戊酯置换后临界点干燥,粘样镀膜后,用 Philip 公司生产的扫描电镜显微镜 XL30ESEM 对菌株 M1 形态进行观察。

1.4.2 分离菌株的 BIOLOG-GP 鉴定 在 Biolog 96 孔平板上,除对照孔不含碳源外,每孔都含有 tetrazolium violet 缓冲营养培养基和不同碳源,菌细胞悬浮于微孔中,培养 72h 后用 Biolog 细菌自动鉴定仪检测供试菌株的代谢指数。

1.5 分离菌株(G+C)mol%含量的测定

细菌总 DNA 提取采用氯仿苯酚混合提取法制备 DNA 溶于 0.1SSC 溶液中。确定 T_m 采用热变性解链法。(G+C)mol% 含量按照经验公式 $0.1SSC G + C\% = 2.44(T_m - 53.9)$ 计算^[5]。

1.6 分离菌株 16S rDNA PCR 扩增和序列测定

16S rDNA 引物^[6,7]:5'-AGAGTTTGATCCTGGC-TCAG-3';5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'。扩增反应体积 $50\mu\text{L}$ ^[8],反应条件:95℃ 5min,94℃ 1min,55℃ 1min,72℃ 2min,29 个循环。取 $5\mu\text{L}$ 反应液在 10g/L 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测^[9]。PCR 产物测序工作由上海申友生物技术公司完成。

1.7 系统发育树构建

由 GenBank 中得到相关菌株的序列(约 600bp),与本文所测得序列一起输入 Clustalx1.8 程序进行 DNA 同源序列排列^[10],并经人工仔细核查。在此基础上,序列输入 PhyliP3.6 软件包,以简约法构建系统发育树^[11]。使用 Kimura 2-parameter 法,系统树各分枝的置信度经重抽样法(Bootstrap)500 次重复检测,DNA 序列变异中的转换和颠换赋予相同的加权值。

1.8 顺式环氧琥珀酸水解酶酶活性的测定

在一定条件下,1g 湿菌体在 1h 内转化顺式环氧琥珀酸二钠生成 $1\mu\text{mol}$ I(+) 酒石酸的活性定义为 1 个酶活单位(U)。

将发酵液 3000r/min 离心 10min,收集的湿菌体作为粗酶,取 5g 湿菌体,加 pH8.04 的磷酸缓冲液 15mL,1mol/L 的顺式环氧琥珀酸二钠溶液 5.0mL 和 5.0mL 生理盐水,充分混匀,于 37℃ 恒温摇床 120r/min 反应 1h,立即取 1mL 反应液 10000r/min 离心 5min,取上清液用于测定酒石酸含量,计算每克湿细胞的酶活力单位^[12]。

酒石酸含量测定参照文献偏钒酸铵法^[13]。

1.9 菌株 M1 的发酵产酶条件研究

1.9.1 碳源对菌株 M1 产酶的影响 做碳源试验时以硫酸铵为氮源,含量 3g/L,碳源量均为 15.0g/L,酵

母膏含量为 1g/L,顺式环氧琥珀酸二钠为 5.0g/L,其余同发酵培养基。

1.9.2 氮源对菌株 M1 产酶的影响 做氮源试验时以 15.0g/L 葡萄糖为碳源,氮的含量为 0.105%,酵母膏含量为 1g/L,顺式环氧琥珀酸二钠为 5.0g/L,其余同发酵培养基。

1.9.3 不同初始 pH 值对菌株 M1 产酶的影响 碳源为 15.0g/L 葡萄糖,氮源为 3.0g/L 硫酸铵,酵母膏为 1.0g/L,顺式环氧琥珀酸二钠为 5.0g/L,其余同发酵培养基。培养基灭菌后分别用盐酸或氢氧化钠溶液调 pH 值。

以葡萄糖、顺式环氧琥珀酸二钠和硫酸铵作为碳源和氮源,以酵母膏为生长因子,进行 4 因素 3 水平的正交试验,以获取最佳培养基组合。顺式环氧琥珀酸二钠添加时间 30h,添加量为 1.79%。

1.9.4 顺式环氧琥珀酸二钠添加量、添加时间、发酵时间对菌株 M1 产酶的影响 做添加量试验时添加时间为 30h;做添加时间试验时,添加量为 1.79%;做发酵时间试验时,添加量为 1.79%,添加时间为 30h。在上述单因子试验的基础上对顺式环氧琥珀酸二钠添加时间、添加量和发酵培养时间 3 个因素各取 3 个水平进行了正交试验设计,以确定最佳组合。

试验分析采用 DPS 系统 Duncan's 新复极差测验的多重比较方法^[14]。

2 结果与分析

2.1 分离菌株的形态

菌株 M1 细胞为革兰氏阳性短杆状,也有长杆状或球杆状;培养时间延长时可呈多型性(图 1)。选择性培养基上的菌落呈浅黄色或淡黄色,边缘光滑,突起,时间延长时菌落渐成桔红色至鲜红色。

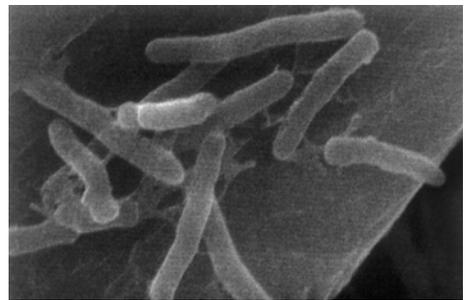


图 1 M1 菌株电镜照片(10000×)

Fig.1 Electron Micrograph of strain M1(10000×)

2.2 M1 菌株的 BIOLOG-GP 鉴定

菌株 M1 细胞经 Biolog 细菌鉴定系统分析,属红

球菌属 (*Rhodococcus* sp.)

2.3 M1 菌株的 (G + C)mol% 含量

由公式计算得 DNA 中的 (G + C)mol% 为 67.2, 符合红球菌属的 (G + C)mol% 含量特征。

2.4 M1 菌株 16S rDNA PCR 扩增和序列同源性比较

菌株 M1 的 16S rDNA PCR 扩增产物大约 1500bp (未示出), 测定了其部分长度的 (约 600bp) 序列。将所得序列通过 Blast 程序与 GenBank 中核酸数据

进行比对分析 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)^[15], M1 菌株的 16S rDNA 序列与红球菌属 (*Rhodococcus*) 多种细菌具有较高同源性 (高于 93%) 与 *Rhodococcus ruber* M2 的同源性高达 99%。

2.5 菌株 M1 的系统发育分析

基于 16S rDNA 序列的系统发育树见图 2。从系统进化树可看出, 分离菌株与红球菌属细菌聚于一群, 并且与 *Rhodococcus ruber* 的 strain M2, strain AS 4.1038 和 strain AS 4.1187 关系最为接近。

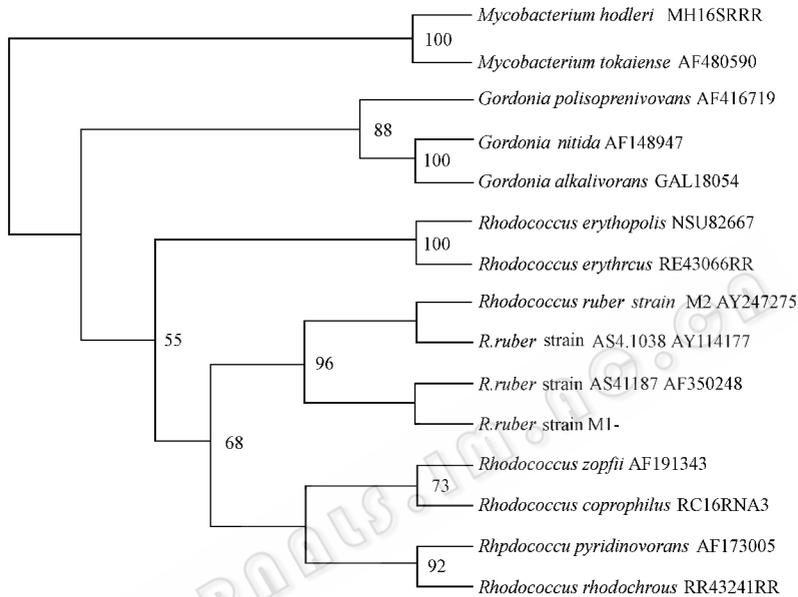


图 2 基于 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence

The relation of *Rhodococcus* strain M1 and related taxa bootstrap values above 50%, expressed as percentages of 500 replications, are shown at the branch points.

2.6 碳源和氮源对 M1 菌株产酶的影响

单因子试验显示, 菌株 M1 以葡萄糖为碳源时酶活较高, 麦芽糖次之, 果糖最差。以硫酸铵为氮源时酶活最高, 氯化铵次之, 不利用硝态氮, 有机氮的利用效果不如无机氮。初始 pH 值对菌株 M1 的产酶影响较大, 初始 pH 值在 7.22 左右时, 酶活达到最高点。

在以上试验的基础上, 进行了葡萄糖、硫酸铵、酵母膏和顺式环氧琥珀酸二钠 4 因子 3 水平的正交试验 (表 1)。可见, 在所试各因素水平范围内顺式环氧琥珀酸二钠浓度对酶活的影响最大。各因素影响依次为: 顺式环氧琥珀酸二钠 > 硫酸铵 > 葡萄糖 > 酵母膏。水平与指标变化关系的表观显示以 $A_1B_2C_1D_1$ 为最佳组合。经验证, 菌株 M1 分别采用 $A_2B_2C_3D_1$ 与 $A_1B_2C_1D_1$ 两种培养基组合时产酶分别

620U/g 和 613.6U/g, 酶活相差不大。在工业放大过程中将采用组合 $A_1B_2C_1D_1$, 即葡萄糖 1.2%, 硫酸铵 0.6%, 酵母膏 0.5%, 顺式环氧琥珀酸二钠 0.7%。

2.7 顺式环氧琥珀酸二钠的流加对 M1 产酶的影响

试验表明, 在 20 ~ 32h 添加顺式环氧琥珀酸二钠时酶活逐渐升高, 32h 时酶活达到最高值, 然后逐渐降低, 随着顺式环氧琥珀酸二钠投加量增加酶活升高, 在顺式环氧琥珀酸二钠投加量达到发酵液的 3.58% 时, 酶活达到最高值。

试验表明发酵时间长短对菌体酶活有较大的影响。在培养至 64h 时以前菌株 M1 的酶活逐渐升高, 64h 时酶活达到最高, 继续培养则酶活下降。66h 时观察到发酵液菌体呈阳性碎片, 70h 时碎片更多, 表明酶活降低可能是菌体发生了自溶。

表 1 葡萄糖、硫酸铵、酵母膏和顺式环氧琥珀酸二钠 4 因素正交试验结果

Table 1 Analysis of orthogonal test with glucose, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, yeast extract and disodium *cis*-epoxysuccinate

No.	Factors				ESH activity (U/g)
	Glucose (g/L)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)	Yeast extract (g/L)	Disodium <i>cis</i> -epoxysuccinate (g/L)	
1	1(12.0)	1(4.0)	1(0.5)	1(7.0)	551(±26.4)
2	1(12.0)	2(6.0)	2(1.0)	2(10.0)	437(±22.8)
3	1(12.0)	3(8.0)	3(1.5)	3(12.0)	551.5(±42.6)
4	2(15.0)	1(4.0)	2(1.0)	2(12.0)	196(±24.2)
5	2(15.0)	2(6.0)	3(1.5)	1(7.0)	629(±36.5)
6	2(15.0)	3(8.0)	1(0.5)	2(10.0)	267(±21.1)
7	3(18.0)	1(4.0)	3(1.5)	2(10.0)	161(±14.6)
8	3(18.0)	2(6.0)	1(0.5)	3(12.0)	531(±31.5)
9	3(18.0)	3(8.0)	2(1.0)	1(7.0)	488.5(±28.6)
K ₁	1539.5	908	1349	1668.5	
K ₂	1092	1597	1121.5	865	
K ₃	1180.5	1307	1341.5	1278.5	
κ_1	513	302.7	450	556	
κ_2	364	532.3	374	288	
κ_3	393.5	435.7	447	426	
R	149	230	76	268	

表 2 顺式环氧琥珀酸二钠添加时间、添加量和菌体发酵时间 3 因素正交实验结果

Table 2 Analysis of orthogonal test with disodium *cis*-epoxysuccinate (inducer) adding time, adding quantity and thalli fermenting time

No.	Factors				ESH activity (U/g)
	Time added /h	Quantity added /%	Fermentation time/h		
1	1(32h)	1(2.34)	1(58h)	588(±26.4)	
2	1(32h)	2(3.56)	2(64h)	118(±12.5)	
3	1(32h)	3(4.69)	3(70h)	750(±14.8)	
4	2(34h)	1(2.34)	2(64h)	112(±8.5)	
5	2(34h)	2(3.56)	3(70h)	728(±5.4)	
6	2(34h)	3(4.69)	1(58h)	266(±15.9)	
7	3(37)	1(2.34)	3(70h)	295(±24.4))	
8	3(37)	2(3.56)	1(58h)	482(±33.1)	
9	3(37)	3(4.69)	2(64h)	418(±20.3)	
K ₁	1456.0	995.0	1336.0		
K ₂	1106.0	1328.0	712.0		
K ₃	1195.0	1434.0	1773.0		
κ_1	485.0	331.7	445.0		
κ_2	368.7	442.6	237.3		
κ_3	398.3	478.0	591.0		
R	116.3	185.0	353.7		

对顺式环氧琥珀酸二钠投加时间、投加量和菌体培养时间三因子进行的正交试验表明,各因素影响大小顺序为:菌体培养时间 > 顺式环氧琥珀酸二钠投加量 > 顺式环氧琥珀酸二钠投加时间。Duncan's 新复极差测验的多重比较结果与正交试验表观显示结果相同,最佳组合为顺式环氧琥珀酸二钠投加时间 32h,投加量 4.69%,菌体培养时间 70h。

3 讨论

红球菌 (*Rhodococcus*) 曾被划分属于分枝杆菌属 (*Mycobacterium*), 70 年代初也曾用过戈登氏菌属^[16] (*Gordonia Tsukamura 1971*) 这一属名。系统进化分析表明,红球菌属与分枝杆菌属、戈登氏菌属确实关系较近,但差别也较明显。BIOLOG-GP 碳源利用结果分析表明,分枝杆菌属 (*Mycobacterium*) 是与红球菌属相似性最大的属。

菌株 M1 与 GenBank 中细菌以 BLAST 软件比较结果显示其 16S rDNA 序列和红球菌属细菌具有较高同源性。(G+C)mol% 含量以及 BILOG-GP 碳源利用结果分析表明菌株 M1 符合红球菌属的特征。菌株 M1 的 16S rDNA 序列与 *Rhodococcus ruber* M2 序列同源性高达 99%。系统进化分析表明该菌与 *Rhodococcus ruber* 的菌株位于同一发育分枝内。该菌可能为 *Rhodococcus ruber* 又一菌株,暂定名为 *Rhodococcus ruber* strain M1。

本文首次报道红球菌可产顺式环氧琥珀酸水解酶,并进行了发酵条件研究。获得产酶条件最优组合为葡萄糖 1.2%,硫酸铵 0.6%;顺式环氧琥珀酸二钠投加时间为 30h,投加量为 3.58%;菌体培养时间 70h。在此条件下,单位湿细胞酶活最高可达 750U/g。

参 考 文 献

- [1] 佐藤英次. 特许出愿公开, 1974 昭 50—140683.
- [2] 张建国, 黄腾华. 微生物转化法生产 L(+)酒石酸的研究. 工业微生物. 1990, 20(2):7-14.
- [3] 孙志浩, 郑璞, 金梅, 等. 顺式环氧琥珀酸水解酶产生菌的筛选及产酶条件. 微生物学报. 1996, 36(2):109-114.
- [4] Dayne G B, Williams P H J. *Organic Chemistry*, 1959, 24(1):54-55.
- [5] 东秀珠, 蔡妙英, 等. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [6] <http://silk.uic.ac.be/primer/database.html>
- [7] Devereux R, Willis S G. Amplification of ribosomal RNA sequences: *Molecular Microbial Ecology Manual*. Netherland: Kluwer Academic Publishers, 1995, 3:3-11.

- [8] 韩如昉, 闵航, 陈美慈, 等. 嗜热厌氧纤维素降解细菌的分离、鉴定及其系统发育分析. *微生物学报*, 2002, **42** (2): 138 - 144.
- [9] Damiani G, Amedeo P, Bandi C, *et al.* Bacteria Identification by PCR-Based Techniques. In: Kenneth W. Adolph ed. *Microbial Genome Methods*. New York: CRC Press, 1996, 167 - 177.
- [10] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 1997, **24**: 4876 - 4882.
- [11] Felsenstein J, Churchill G A. A hidden Markov model approach to variation among sites in rate of evolution. *Mol Biol and Evol*, 1996, **13**: 93 - 104.
- [12] 郑璞, 孙志浩. 用诺卡式菌酶法转化顺式环氧琥珀酸生产 L(+)-酒石酸的研究. *工业微生物*. 1994, **24** (3): 12 - 17.
- [13] 刘叶青, 严文康, 周文龙, 等. 酒石酸的比色测定法. *工业微生物*. 1983, **13** (6): 32 - 37.
- [14] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统. 北京: 科学出版社, 2002, 5.
- [15] Altschul, Stephen F, Thomas L. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25**: 3389 - 3402.
- [16] Michio T, Ikuya Y, Takuji K, *et al.* *Rhodococcus roseus* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1991, **41** (3): 385 - 389.

Isolation, Identification and Phylogenetic Analysis of *Rhodococcus* sp. Strain M1 Producing *cis*-epoxysuccinate Hydrolase and Optimization of Production Conditions

PAN Ke-Xia MIN Hang* XIA Ying XU Xiao-Yu RUAN Ai-Dong
(College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: Strain M1, capable of producing *cis*-epoxysuccinate hydrolase (ESH) with high yield, was isolated from the soil on campus of Zhejiang University, and identified as *Rhodococcus ruber* based on physiological experiment, Biolog carbon source utilization experiment and phylogenetic analysis of 16S rDNA sequence. The conditions for enzyme formation of strain M1 were optimized. The optimum conditions were glucose 1.2% (NH₄)₂SO₄ 0.6% and yeast extract 0.5%, the time and quantity of adding disodium *cis*-epoxysuccinate was 32h and 3.58%, respectively. The ESH activity was about 750U/g wet cells when the organism was cultured under above optimized conditions. This is the first report dealing with strain producing the *cis*-epoxysuccinate hydrolase in *Rhodococcus*.

Key words: *Rhodococcus*, *cis*-epoxysuccinate hydrolase, Phylogenetic analysis, Fermentation, L(+)-tartaric acid

Foundation item: Business project of Zhejiang province.

* Corresponding author. Tel: 86-571-86971287; E-mail: minhang@zju.edu.cn

Received date: 03-07-8

本刊重要声明

为适应我国信息化建设需要, 扩大作者学术交流渠道, 本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网”。如作者不同意将文章编入该数据库, 请在来稿时声明, 本刊将做适当处理。

另外, 从 2002 年开始, 凡被本刊录用的文章均统一纳入“万方数据——数字化期刊群”, 进入因特网提供信息服务。有不同意见者, 请事先声明。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬, 不再另付。

《微生物学报》编辑部