

一株假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) 产生的胞外脂酶

朱明华 李祖义

(中国科学院上海有机化学研究所, 上海)

杜彬 周姚宇 郑伟军

(云南省农业科学院生物工程研究室, 昆明)

假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) 生长在一定的培养条件中能产生胞外脂酶。最适碳源为 1.0% 淀粉, 氮源为 1.0% 蛋白胨。一些植物油, 如橄榄油、糠油、菜油等能诱导脂酶的大量产生, 诱导脂酶产生的橄榄油最适浓度为 0.5%。无机离子在菌培养过程中对脂酶产率影响很大, K^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等对脂酶产生有促进作用, 而 Mn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 等则抑制脂酶产生。非离子表面活性剂(如 tween、span 及糖脂)能刺激胞外脂酶的产生。

关键词 假单胞菌; 胞外脂酶

脂酶是类脂化合物合成、分解和酯交换的催化剂。它具有化学选择性, 即从混合物中选择性地作用于特殊作用物。还具有立体选择性, 可辨别对映体, 当底物为消旋体时, 可得到高产率的光学活性产物。脂酶还是一个胶束酶, 不需将底物溶于水, 在有机相与水相的界面处, 脂酶催化反应活性最高。另外脂酶不需要辅酶进行酶催化反应, 具有很强的适应性, 有的脂酶能耐温 60—70℃。脂酶的上述特性使脂酶可应用于有机化合物的化学合成、酯交换、有机化合物的不对称合成及消旋化合物的拆分等方面。

有关微生物产生的脂酶陆续有一些报道^[1], 我们实验室筛选到一株假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.), 它在一定条件下能产生较高活力的胞外脂酶, 本文就培养的最佳条件进行探讨。

材料和方法

(一) 菌种和培养条件

1. 菌种: 筛选获得, 初步鉴定为假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.)。
2. 培养基成分 (g/L): 蛋白胨 10, 牛肉膏 5, NaCl 5, pH 6.5—7.0。
3. 菌体培养: 100 ml 培养基装于 500 ml 三角瓶中, 接一白金耳菌量, 往复摇床 (120 r/min) 28℃ 培养 24 小时, 此为前培养。将此培养液 5 ml 转接入不同条件培养液中, 同样培养。

(二) 脂酶活性测定

参照滴定法^[2]和比色法^[3]进行。结果中所列数据均为滴定法。每分钟从底物(橄榄油)中释放出 1 μ mol 脂肪酸的酶量定义为一个酶活力单位。酶液由发酵液离心除去菌体后获得。

本文于 1989 年 3 月 9 日收到。

(三) 菌干重测定

菌体由发酵液离心得到, 用生理盐水洗涤, 90℃ 烘干, 称重。

结果和讨论

(一) 初始 pH 对脂酶产率和菌体生长的影响

培养液成分(%)为: 淀粉 1.0, 蛋白胨 1.0, 酵母膏 0.2, K_2HPO_4 0.2, 橄榄油 0.5, 初始 pH 5.5—8.5。培养 48 小时的结果见表 1。培养液初始 pH 对菌体生长影响较大, pH 为 7.0 左右时, 菌体生长较好。pH 6.5 时产脂酶较有利。以下实验所用初始 pH 均为 6.5。

表 1 初始 pH 对脂酶产率和菌体生长的影响

Table 1 Effect of initial pH on lipase production and cell growth

初始 pH Initial pH	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5
脂酶活性 (u/ml) Lipase activity	2.5	2.7	3.1	2.8	2.6	2.5	2.4
菌干重 (g/L) Biomass	5.1	5.4	5.9	7.0	6.3	5.8	5.4

表 2 碳源对脂酶产率和菌体生长的影响

Table 2 Effect of carbon sources on lipase production and cell growth

碳源 (1.0%) Carbon sources	菌干重 (g/L) Biomass	脂酶活性(u/ml) Lipase activity
淀粉 Starch	5.0	0.45
蔗糖 Sucrose	5.3	0.27
葡萄糖 Glucose	5.2	0.31
橄榄油 Olive oil	3.2	0.32
糠油 Rice oil	3.4	0.22
菜油 Rape oil	2.9	0.17
红花油 Safflower oil	2.4	0.22
牛油 Beef tallow	3.0	0.25

(二) 碳源对脂酶产率和菌体生长的影响

培养液以 1.0% 蛋白胨和 0.2% 酵母膏作氮源, 加 0.2% K_2HPO_4 , 碳源为碳水化合物(淀粉、蔗糖、葡萄糖)或动植物油(橄榄油、糠油、菜油、红花油、牛油), 28℃ 培养 48 小时, 结果见表 2。培养液的碳源成分对该菌脂酶产率和菌体生长影响很大。以碳水化合物作碳源时, 菌体生长良好, 发酵液中脂酶产率一般, 其中以淀粉作碳源时脂酶产率较高 (0.45 u/ml)。以动植物油作碳源, 菌体生长不如碳水化合物, 发酵液中脂酶产率也较低。在以后的培养液中, 均以淀粉作为碳源。

(三) 脂肪对脂酶产生的影响

培养液组成(%)为: 淀粉 1.0, 蛋白胨 1.0, 酵母膏 0.2 和 K_2HPO_4 0.2, 另加脂肪 0.5。图 1 表示该菌在不同脂肪培养液中菌体生长和脂酶产生的情况。脂肪的加入对菌体生长影响不大, 但都不同程度地提高了脂酶的产率。可见, 作为脂酶底物的脂肪不但可以作为碳源, 而且还是脂酶产生的诱导物, 特别是橄榄油的加入, 使菌体培养 48 小时脂酶产率从 0.45 u/ml 提高到 3.1 u/ml。另外, 糠油、菜油效果也较好, 而动物脂肪对脂酶产生影响较小。这是否与其脂肪酸组成及熔点有关(植物油大部分由不饱和脂肪酸组成, 而动物油的脂肪酸大部分是饱和的), 还需进一步探讨。Dwayne^[4] 和 Suzuki 等^[5] 也发现橄榄

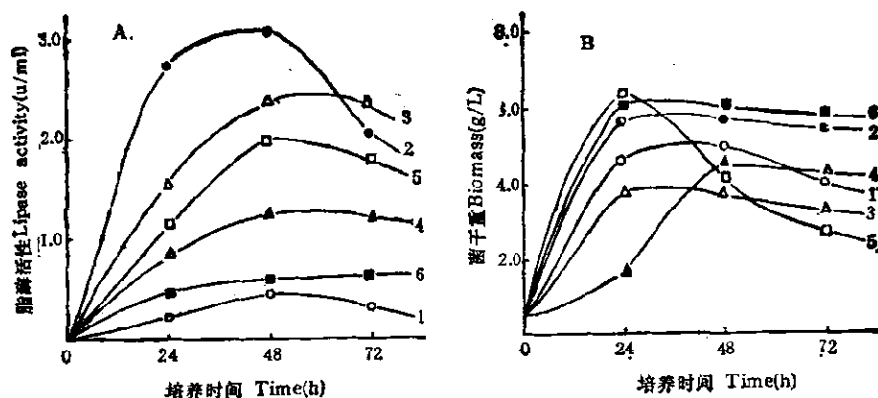


图1 不同种类脂肪对脂酶产率(A)、菌体生长(B)的影响

Fig. 1. Effect of different kinds of fat on lipase production (A), cell growth (B)

1.无 None; 2.橄榄油 Olive oil; 3.糠油 Rice oil; 4.菜油 Rape oil; 5.红花油 Safflower oil; 6.牛油 Beef tallow

表3 橄榄油浓度对脂酶产率和菌体生长的影响

Table 3 Effect of olive oil concentration on lipase production and cell growth

橄榄油浓度 (%) Olive oil concentration	0	0.25	0.5	0.75	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
菌干重 (g/L) Biomass	5.0	5.3	5.9	7.1	7.8	8.2	8.4	8.5	8.4
脂酶活性 (u/ml) Lipase activity	0.45	1.6	3.1	2.3	1.8	1.6	1.4	1.4	0.8

表4 不同浓度的淀粉和橄榄油对脂酶产率和菌体生长的影响

Table 4 Effect of starch and olive oil concentration on lipase production and cell growth

淀粉浓度 (%) Starch concentration	0.5				1.0				2.0			
橄榄油浓度 (%) Olive oil concentration	0	0.5	1.0	2.0	0	0.5	1.0	2.0	0	0.5	1.0	2.0
菌干重 (g/L) Biomass	2.5	4.5	6.6	7.1	5.0	5.9	8.0	9.1	6.2	6.9	9.0	8.9
脂酶活力 (u/ml) Lipase activity	0.13	1.2	1.7	1.8	0.45	3.1	1.9	1.7	0.8	1.5	1.3	0.9

油对脂酶有诱导作用。

(四) 橄榄油浓度对脂酶产率的影响

从上可以看出, 橄榄油对脂酶产生起很大的促进作用。以 1.0% 蛋白胨和 0.2% 酵母膏作氮源, 加 0.2% K_2HPO_4 。碳源为 1.0% 淀粉, 橄榄油浓度为 0—3.0%。菌体

培养 48 小时, 橄榄油浓度对脂酶产率的影响见表 3。低浓度的橄榄油能诱导脂酶的大量产生, 随着橄榄油浓度的增高, 诱导效率逐渐减弱, 而此时菌体大量生长。可见, 橄榄油以作碳源为主还是以作诱导物为主, 取决于橄榄油在培养液中的浓度。

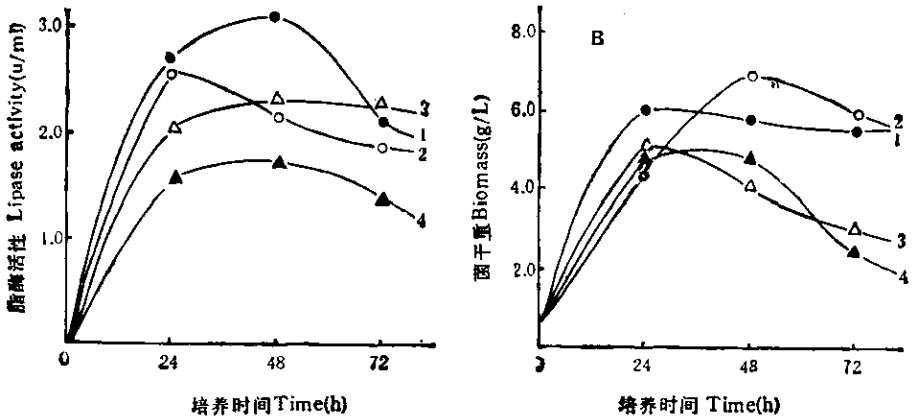


图 2 氮源对脂酶产率 (A) 和菌体生长 (B) 的影响
Fig. 2 Effect of nitrogen sources on lipase production (A), cell growth (B)
1. 蛋白胨 Peptone; 2. 大豆粉 Soybean meal; 3. 尿素 Urea; 4. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Kosaric, N. 等^[6]也得到类似结果,他们认为高浓度的橄榄油对脂酶产生的促进减弱,可能因为这时橄榄油促进了其它蛋白质的合成。

(五) 不同浓度淀粉和橄榄油对脂酶产率的影响

培养液组成(%)为: 蛋白胨 1.0, 酵母膏 0.2, K_2HPO_4 0.2, 以淀粉作碳源,培养 48 小时。从表 4 看出,不同浓度淀粉、橄榄油对脂酶产率和菌体生长影响很大。淀粉的浓度较低时,随橄榄油浓度增高,脂酶产率逐渐提高;淀粉浓度较高时,随橄榄油浓度增高,脂酶产率有下降趋势。最适于脂酶产生的淀粉、橄榄油浓度分别为 1.0% 和 0.5%,此时菌体生长也较好。

(六) 氮源对脂酶产率和菌体生长的影响

用四种不同氮源来试验该菌产脂酶的情况。培养液由 1.0% 淀粉、0.5% 橄榄油、0.2% K_2HPO_4 组成,以 0.2% 酵母膏作辅助氮源,结果见图 2。蛋白胨、大豆粉作氮源对该菌产脂酶有利,菌体生长良好。蛋白胨较大豆粉为好,在我们的实验中以蛋白胨作氮源。

表 5 不同无机盐对脂酶产率和菌体生长的影响
Table 5 Effect of different salts on lipase production and cell growth

无机盐 Salts	菌干重 (g/L) Biomass	脂酶相对活性 Lipase activity (percent of control)
无 None	5.1	100
K_2HPO_4	5.3	147
KH_2PO_4	5.5	124
NaCl	5.7	107
CaCl_2	4.4	159
MgSO_4	4.2	141
ZnSO_4	4.9	0
FeCl_3	3.1	0
MnSO_4	5.0	58.8
CoSO_4	4.1	0
CuSO_4	3.3	0
BaCl_2	5.5	58.8

(七) 无机盐对脂酶产率和菌体生长的影响

培养液组成(%)为: 淀粉 1.0, 蛋白胨 1.0, 酵母膏 0.2, 橄榄油 0.5, 外加 0.02 mol/L 无机盐,培养 48 小时。从表 5 可以看出, K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 NaCl 和 MgSO_4 对该菌脂酶产率有不同程度的促进作用; MnSO_4 、 BaCl_2 则部分抑制脂酶产率; ZnSO_4 、 FeCl_3 、 CoSO_4 及 CuSO_4 等几

表6 非离子表面活性剂对脂酶产率和菌体生长的影响

Table 6 Effect of non-ionic surfactants on lipase production and cell growth

非离子表面活性剂 (0.5%) Non-ionic surfactants	菌干重 (g/L) Biomass	脂酶活性 (u/ml) Lipase activity
无 None	5.0	0.45
司班-85 Span-85	7.9	7.3
吐温-60 Tween-60	5.1	3.6
吐温-80 Tween-80	6.0	4.7
吐温-85 Tween-85	7.7	7.7
鼠李糖脂 Rhamnolipid	4.8	0.48
槐糖脂 Sophorolipid	4.3	0.47
脂多糖 Emulsan	4.6	0.54

乎完全抑制了脂酶。金属离子对一些脂酶的激活、抑制作用有过一些报道, Bashkatova^[7] 对假单胞菌脂酶受无机离子影响作了研究,发现只有 Mg^{2+} 对脂酶活力有激活作用,这可能是菌株不同的原因。

(八) 表面活性剂对脂酶产率和菌体生长的影响

脂酶是一个胶束酶,表面活性剂能影响其在油水界面上的作用和界面性质。阴离子表面活性剂与脂酶蛋白质相互作用,破坏脂酶的活性中心而产生抑活作用。而非离子表面活性剂很难发生这样的结构变化,因为非离子表面活性剂与蛋白质和脂酶活性中心相互作用是弱电性的。一些非离子表面活性剂如 tween、span 及糖脂型生物表面活性剂,它们本身也是一种脂类化合物,对脂酶能起诱导作用,因此我们试验了各种非离子表面活性剂对脂酶的影响。培养基成分(%)为:淀粉 1.0,蛋白胨 1.0,酵母膏 0.2, K_2HPO_4 0.2,另添加表面活性剂 0.5。表 6 所示的是培养 48 小时的结果。各表面活性剂均能不同程度地

提高脂酶的产率。由于各种非离子表面活性剂的结构差异,它们对脂酶的促进作用也有差别,span-85 及 tween-85 的刺激作用最佳,而生物表面活性剂的刺激作用就不很明显。最近, Nahas, E.^[8] 用 tween-20、tween-80 对根霉产脂酶的作用进行了研究,得到了类似的结果,即对脂酶产生有促进作用。

参 考 文 献

- [1] Sztajer, H. et al.: *Acta Biotechnol.*, 8(2): 169, 1988.
- [2] Watanabe, N. et al.: *Age. Biol. Chem.*, 41 (8): 1353, 1977.
- [3] Kmon, D. H. et al.: *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 63(1): 89, 1986.
- [4] Dwayne, D. et al.: *Biotechnol. Lett.*, 10(9): 637, 1988.
- [5] Suzuki, T. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27(5—6): 417, 1988.
- [6] Kosaric, N. et al.: *Biotechnology and Bioengineering*, 11: 1133, 1979.
- [7] Bashkatova, N. A. et al.: *Mikrobiologiya*, 47 (2): 234, 1987.
- [8] Nahas, E.: *Journal of General Microbiology*, 134: 227, 1988.

PRODUCTION OF EXOLIPASE BY *PSEUDOMONAS* SP.

Zhu Minghua Li Zuyi

(Shanghai Institute of Organic Chemistry, Shanghai)

Du Bin Zhou Yaoyu Zheng Weijun

(Laboratory of Biotechnology, Yunnan Academy

of Agricultural Sciences, Kunming)

Under certain culture conditions, a strain of *Pseudomonas* sp. was able to produce exolipase. The optimal medium compositions for lipase producing contains 1.0% starch (carbon source) and 1.0% peptone (nitrogen source). Some kinds of vegetable oil, such as olive oil, rice oil, rape oil could induce lipase production. High yield of exolipase was obtained when the concentration of olive oil was 0.5%. Inorganic ions could affect the production of

exolipase: K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , could increase the lipase activity, whereas Mn^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Cu^{2+} inhibited it. Non-ionic surfactants (tween, span, glycolipid) could stimulate the production of exolipase.

Key words

Pseudomonas; Exolipase