

脂肪酶产生菌的选育及产酶条件的优化

高修功¹ 章克昌¹ 曹淑桂²

(¹ 无锡轻工大学生物工程系 无锡 214036)

(² 吉林大学酶工程国家重点实验室 长春 130023)

关键词 脂肪酶, 假单胞菌, 分离, 诱变, 优化

分类号 Q939.97

脂肪酶(EC3.1.1.3)是一类重要的水解酶,在食品、皮革、医药和洗涤剂等诸多工业领域中均有广泛应用^[1]。近年来,非水相酶学的研究又进一步拓展了脂肪酶的应用领域,利用脂肪酶在有机相催化的各种反应可以合成许多高价值产品^[2]。在各种来源的脂肪酶中,以细菌脂肪酶在有机相中催化的反应类型最多、反应活性及稳定性最高,其中假单胞菌属(*Pseudomonas*)菌株所产脂肪酶尤为显著^[3,4]。

我国对微生物脂肪酶的研究与开发较晚,有关细菌脂肪酶的研究报道甚少^[1,5]。本文报道了产脂肪酶细菌菌株的分离、鉴定、诱变及产酶条件优化等方面的研究结果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂:聚乙烯醇(PVA):聚合度 1750 ± 50 ,上海石化水处理厂;橄榄油:化学纯,上海化学试剂供应站;三丁酸甘油酯:化学纯,上海试剂二厂;亚硝基胍:Fluka(Switzerland);豆饼粉和玉米浆由无锡酶制剂厂提供,其它试剂均为国产分析纯或化学纯。

1.1.2 主要仪器:酸度计:pHS-3C型,上海雷磁仪器厂;高速组织捣碎机:DS-1型,上海标本模型厂。

1.2 实验方法

1.2.1 富集培养基组成(%):橄榄油 2.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5, 蛋白胨 1.0, K_2HPO_4 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, 用 Na_2CO_3 调节 pH 至 9.5~10.0。

1.2.2 富集方法:取 1g 土样加入盛有 10 ml 无菌水的试管中,振荡后取 5 ml 悬浮液加入盛有 25 ml 富集培养基的三角瓶中,30℃,150r/min 摇瓶培养。3~5d 后,移取 5 ml 培养液至另一盛有新鲜培养基的三角瓶中继续培养。重复同样操作 5~6 次,平板分离。

1.2.3 平板分离培养基组成及制备:在肉汁胨培养基中加入 2.5% 橄榄油和 1.5% 琼脂,用 Na_2CO_3 调节 pH 至 9.5~10.0,灭菌后冷却到 60℃,加入维多利亚蓝 B(4mg/100ml),保持无菌条件乳化 1min 倒平板。

1.2.4 平板分离方法:将经富集培养的菌液用无菌水适当稀释,取一定量涂布分离平板。30℃ 培养 2~3d,将有蓝绿色变色圈的菌落挑至肉汁胨斜面培养基上保藏,供初筛用。

1.2.5 初筛培养基组成及制备:三丁酸甘油酯双层琼脂平板,底层含琼脂 1.5%,三丁酸甘油酯 0.5%,分装试管(10ml/支),灭菌后乳化(快速混匀)倒平板;表层为肉汁胨培养基(含 1.5% 琼脂),分装试管(10ml/

支)灭菌,待底层凝固后倒入平皿。

1.2.6 初筛方法:将平板分离到的菌株从新鲜斜面上用无菌水洗下,经适当稀释后涂布初筛培养基,30℃培养3 d,将透明圈较大的菌落挑至肉汁胨斜面培养基上保藏,供复筛用。

1.2.7 复筛及发酵培养基组成(%):豆饼粉2.0,玉米浆2.0,可溶性淀粉1.0, K_2HPO_4 0.5, $NaNO_3$ 0.5, pH 9.0, 250ml三角瓶装液30ml, 0.1MPa灭菌20 min。

1.2.8 复筛及发酵方法:挑取一环新鲜肉汁胨斜面种子,接入肉汁胨液体种子培养基中,30℃、150 r/min下培养24 h。然后取1ml液体种子于发酵培养基中,在一定的温度和摇床转速下摇瓶发酵72 h。发酵液离心(3000 r/min, 20 min),取上清液测定酶活。

1.2.9 菌种鉴定:根据文献[6]和[7]的方法进行特性鉴定,并以《伯杰氏细菌鉴定手册(第八版)》^[8]作为分类参考。

1.2.10 菌种诱变:紫外线诱变和亚硝基胍诱变采用常规诱变方法^[7]。

1.2.11 脂肪酶水解活力测定:橄榄油乳化法^[9]。以在40℃、pH9.0的条件下,水解橄榄油每分钟产生1μmol游离脂肪酸所需的酶量定义为一个单位(U)。

2 结果和讨论

2.1 产脂肪酶细菌菌株的分离

在油脂厂等经常接触油脂类物质的场所附近采集土样共37个。在较高pH(9.5~10.0)和以橄榄油为唯一碳源的富集培养基中富集6~8次后,经适当稀释涂布分离平板,挑选有蓝绿色变色圈的菌落涂布初筛平板,然后挑选有较大透明圈者进一步复筛。初筛共挑得单菌落180株,复筛发现95%以上的菌株具有一定的产酶能力,产酶能力较高者(>5U/ml)有25株,其中由21号土样筛得的2106菌株酶活最高,达11.30U/ml。

2.2 菌种鉴定

根据对2106菌株的形态特征、培养特征及主要生理生化特征的初步研究,确定该菌株为假单胞菌属(*Pseudomonas*),编号为*Pseudomonas* sp. 2106。

2.3 诱变育种

先后采用紫外线照射及亚硝基胍处理对2106菌株进行了诱变。

2.3.1 紫外线诱变结果:将致死率超过99.0%的照射样品,经中间培养后初筛,挑选透明圈相对较大的81株复筛,结果发现正突变株有10株,其中A14与A25的产酶能力明显高于其它8株,酶活达54.7U/ml和52.4U/ml,分别较出发菌株提高了187%和175%。选择A14作为出发菌株进行亚硝基胍诱变。

2.3.2 亚硝基胍诱变结果:将致死率为90%的处理样品经中间培养后初筛,挑选透明圈较大者67株复筛,获得一株正突变株H18,其酶活达64.0U/ml,较A14提高了17.1%,为2106菌株的3.25倍。

将H18菌株在肉汁胨培养基上传接5代,每代接种发酵测定酶活,结果分别为(U/ml):64.0、64.8、63.1、62.8和64.5,可初步认为该菌株具有较好的传代稳定性。

2.4 H18菌株产酶条件优化

2.4.1 Plackett-Burman法筛选产酶重要影响因素:实验中采用Plackett-Burman实验设计^[10]对影响H18产酶的重要因素进行了筛选。选用N=12的实验设计对8个因素(包括培养条件及培养基组成)进行研究,实验设计及结果如表1所示,各因素所代表的参数、水平及分析结果见表2。结果分析参见Stowe和Mayer的方法^[11]。

表1 N=12的Plackett-Burman实验设计与结果

序号	A	B	(C)	D	E	(F)	G	H	(I)	J	K	酶活(U/ml)
1	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	75.1
2	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	69.9
3	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	73.1
4	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	72.5
5	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	75.1
6	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	69.6
7	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	73.4
8	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	80.3
9	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	73.7
10	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	79.4
11	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	79.6
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	65.7

表2 各因素、水平及其影响效果

因 素		水 平		效果	相对重要性 t检验
代码	参 数	低(-)	高(+)	(+)-(-)	
A	发酵温度(℃)	32	35	-0.7	0.79
B	培养基起始pH	9.0	9.5	-1.0	1.13
(C)	空项			0.1	
D	摇瓶转速(r/min)	150	180	0.4	0.45
E	豆饼粉(%)	2.0	2.5	2.5	2.82
(F)	空项			1.5	
G	玉米浆(%)	2.0	2.5	6.4	7.23
H	可溶性淀粉(%)	1.0	1.5	1.5	1.69
(I)	空项			0.3	
J	K ₂ HPO ₄ (%)	0.50	0.75	3.7	4.18
K	NaNO ₃ (%)	0.50	0.75	1.8	2.03

2.4.2 响应面分析(RSA)优化培养基组成: 以可信度高于 90% 的三个因素(豆饼粉、玉米浆、K₂HPO₄)为自变量, 发酵酶活为响应值, 采用响应面分析法^[12]在三因素三水平上对培养基组成进行优化。其它可信度较小的因素说明对产酶无明显影响, 维持在较低水平上。三个实验因素与水平的选取如下:

豆饼粉(X₁): -1:2.0% 0:2.5% 1:3.0%
玉米浆(X₂): -1:2.0% 0:2.5% 1:3.0%
K₂HPO₄(X₃): -1:0.5% 0:0.75% 1:1.0%

实验安排及结果见表 3。
将实验数据进行回归拟合, 可得到响应值(Y)与各因子(X₁, X₂, X₃)之间的下列函数关系:
$$Y = 88.33 + 0.78 * X_1 + 6.88 * X_2 + 4.48 * X_3 - 4.47 * X_1^2 - 7.87 * X_2^2 - 5.02 * X_3^2 - 1.80 * X_1X_2 + 0.40 * X_1X_3 + 1.55 * X_2X_3$$

根据上述回归方程作出响应面分析图示于图 1 中。
可以看出, 豆饼粉浓度的变化对产酶影响不显著, 玉米浆和 K₂HPO₄浓度的变化对产酶有显著的影

表3 响应面试验设计安排及试验结果

试验号	豆饼粉 X_1	玉米浆 X_2	K_2HPO_4 X_3	酶活(U/ml)
1	-1	-1	0	68.0
2	-1	0	-1	73.1
3	-1	0	1	81.9
4	-1	1	0	83.9
5	0	-1	-1	65.1
6	0	-1	1	70.3
7	0	1	-1	77.5
8	0	1	1	88.9
9	1	-1	0	72.0
10	1	0	-1	75.0
11	1	0	1	85.4
12	1	1	0	80.4
13	0	0	0	87.6
14	0	0	0	89.1
15	0	0	0	88.3

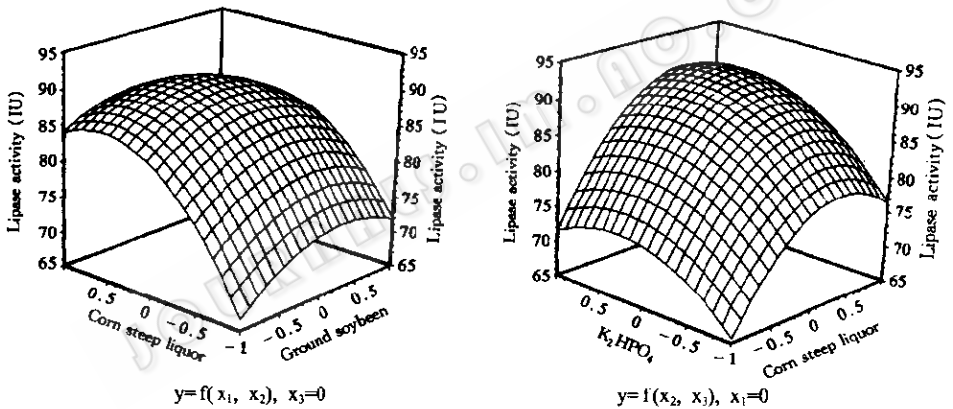


图1 响应面分析立体图

响,二者相比玉米浆的影响更为显著。为了确定各组分最佳用量,用 Box 的 complex algorithm 法^[13]对上述回归方程在 $-2 < X_i < 2(i=1,2,3)$ 的范围内求取最大值,解得各组分的取值为: $X_1 = 0.012, X_2 = 0.485, X_3 = 0.552$, 相当于: 豆饼粉, 2.51%; 玉米浆, 2.74%; K_2HPO_4 , 0.87%。此时模型预测的酶活最高水平为 91.1U/ml, 实际发酵酶活为 87.5U/ml, 说明该模型能够较好地预测实际发酵情况。

综上所述, H18 菌株脂肪酶发酵生产最佳培养基组成为: 豆饼粉, 2.51%; 玉米浆, 2.74%; 可溶性淀粉, 1.0%; K_2HPO_4 , 0.87%; $NaNO_3$, 0.5%。最佳发酵条件为: 发酵温度, 32℃; 培养基起始 pH, 9.0; 摇瓶转速, 150 r/min。

参 考 文 献

- [1] 徐家立. 脂肪酶. 见: 张树政主编. 酶制剂工业(下). 北京: 科学出版社, 1984. 655~670.
- [2] Dordick J S. Principles and Applications of Nonaqueous Enzymology. In: Blanch H W, Clark D S ed.

- Applied Biocatalysis. Vol. 1. New York: Marcel Dekker Inc, 1991. 1~51.
- [3] Mcneil G P, Yamane T. *J Am Oil Chem Soc*, 1991, **68**(1):6~10.
- [4] Riva S, Chopineau J, Kieboom A P G *et al. J Am Chem Soc*, 1988,**110** (2):584~589.
- [5] 施巧琴. 微生物学通报, 1981, **8** (3): 108~110.
- [6] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1978.
- [7] Gerhardt P 主编(厦门大学生物系微生物学教研室译). 普通细菌学方法手册. 厦门: 厦门大学出版社, 1989.
- [8] Buchanan R E, Gibbons N E. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th ed. New York: Williams and Wilkins, 1974.
- [9] Yamada K, Ota Y, Machida H. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 1962, **36**:860.
- [10] Plackett R L, Burman J P. *Biometrika*, 1946, **33**:305~325.
- [11] Stowe R A, Mayer R P. *Ind Eng Chem*, 1966, **58** (2):36~40.
- [12] Box G E P, Hunter W G, Hunter J S. *Statistics for Experimenters*. New York: John Willey & Sons, 1978. 510~539.
- [13] Box M J. *Computer J*, 1965, **8**:42~52.

ISOLATION OF A LIPASE-PRODUCING *PSEUDOMONAS* STRAIN AND OPTIMIZATION OF ITS FERMENTATION CONDITIONS

Gao Xiugong¹ Zhang Kechang¹ Cao Shugui²

(¹ Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

(² National Laboratory of Enzyme Engineering, Jilin University, Changchun 130023)

Abstract A lipase-producing bacterium strain was isolated from soil and was identified as *Pseudomonas* sp.. Its lipase yield was improved 2.25-fold by combined treatment of UV irradiation and NTG. The lipase fermentation condition for the mutant strain was optimized with Plackett-Burman design and Response Surface Analysis (RSA), and the formula of the optimum medium suitable for industrial scale fermentation was thereby established. A maximum yield of 87.5 U/ml was obtained.

Key words Lipase, *Pseudomonas* sp., Isolation, Mutation, Optimization