

脂肪酶高产菌株选育和菌种库的建立*

宋 欣 魏留梅 刘瑞田 曲音波**

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘要:从山东省济南市植物油厂、肉联厂、乳品厂、菜市场等处的含油土壤中分离筛选到 80 余株脂肪酶活性较高的产生菌,包括细菌、霉菌、酵母等各种类型,我们对其中的部分菌株进行了形态学及酶学性质的初步研究。一株酶活较高的菌株 Y-11 经鉴定为丝孢酵母属 (*Trichosporon*),用紫外线及亚硝酸对其进行了双重诱变,然后用制霉菌素及琥珀酸钠筛选耐药性突变株,使酶活提高了 155%,并将筛选到的菌株建立一个能够产生各具特色的脂肪酶的菌种库,为今后进一步开展脂肪酶应用研究打下基础。

关键词:脂肪酶,丝孢酵母,耐药性突变株,菌种库

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 01-0006-0

SCREENING OF STRAINS PRODUCING LIPASES WITH HIGH ACTIVITIES AND CONSTRUCTION OF STRAIN LIBRARY

SONG Xin WEI Liu-Mei LIU Rui-Tian QU Yin-Bo

(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong Univ, Jinan 250100)

Abstract: More than 80 strains producing lipases were screened from oily soil of vegetable oil plant, meat processing factory and dairy factory in Jinan city, Shandong Province, which included bacteria, moulds and yeast. Conditions for lipase production and properties of some enzymes were studied. One drug-resistant mutant strain Y-11 with higher lipase activity was from *Trichosporon* sp. Y-1. In addition, Optimization of lipase production and characterization of enzymes were carried out. On the basis of above experiments, a characteristic library of stains producing lipases was established.

Key Words: Lipase, *Trichosporon*, Drug-resistant mutant, Library of lipase-producing strains

近十几年来,随着非水酶学和界面酶学研究的的进展,脂肪酶在应用方面的开发研究也加快了步伐,在乳品工业中,可以利用脂肪酶水解油脂后产生的链较短的脂肪酸(主要是 C_4 和 C_6),增加和改进干酪及其他乳制品的风味和香味;在去垢剂工业中,可以用作洗涤助剂以提高去污能力;用于造纸工业,可以除去树脂对纸浆加工的妨碍。尤其是利用脂肪酶催化的反应往往具有高度的立体选择性这一特性,还可以在溶液中选择性水解特定酯键,生产多不饱和脂肪酸、类可脂、甘油等产品;在有机相中进行酯化、转酯等反应,专一性地制备类固醇、维生素、激素、液晶等许多利用化学法难以合成的光学活性化合物或其中间体。这些新用途,或需求量巨大(如洗涤用酶、造纸用酶),或附加值很高(如手性药物和农药),因而具有良好的发展前景。

本研究旨在针对这些迅猛扩展的脂肪酶的新用途,通过筛选及收集国内外的产酶

* 山东省科技厅基金资助项目

** 通讯联系人, TEL: 8564431-8303, FAX: 8565234, E-mail: lifezds@schu.edu.cn

收稿日期: 2000-11-13, 修回日期: 2001-02-10

菌株和酶制剂,建立我们自己有特色的菌种库和脂肪酶库,为开发脂肪酶的新用途提供良好的基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

从山东省济南市植物油厂、乳品厂、肉联厂、菜市场等处采集土样 22 个,从中分离出若干产酶菌株。

1.2 培养基

1.2.1 富集培养基:酵母膏 2g,橄榄油 5g, K_2HPO_4 1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g, $(NH_4)_2SO_4$ 1g, NaCl 0.5g, pH 6.0 和 pH 7.5 定容于 1L 容量瓶中。

1.2.2 平板初筛培养基: $(NH_4)_2SO_4$ 1g, K_2HPO_4 1g, KCl 0.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g, 橄榄油 10.0g, 聚乙烯醇 1g, 琼脂 15-20g, pH 8.5 定容于 1L 中。

1.2.3 复筛培养基:黄豆粉 40.0g, 蔗糖 10.0g, 橄榄油 10.0g, $(NH_4)_2SO_4$ 1.0g, K_2HPO_4 2.0g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g, pH 6.0, 定容 1L。

1.3 试剂及原料

聚乙烯醇(PVA)(平均聚合度 1750 ± 50), 橄榄油为上海化学试剂站国产分装试剂,其他试剂均为分析纯。

1.4 方法

1.4.1 脂肪酶活力测定:按照文献[1]的橄榄油底物乳化法进行测定。

1.4.2 诱变筛选方法:对活化后分散在培养皿中的 Y-1 细胞用 15W 的紫外灯,在距离光源 20cm 处先照射 10min,然后开盖照射 1min,再用终浓度为 0.02mol/L 的亚硝酸进行二次诱变,稀释,将不同浓度的菌液涂于含有 120u/mL 制霉菌素和 180 mg/mL 琥珀酸钠的初筛平板上,28℃培养 48h,比较长出的菌落及透明圈的大小,将挑选出的菌株进行摇瓶发酵,28℃,160r/min,96h 后测定发酵液的脂肪酶活力。

2 结果

2.1 产酶菌种的分离和脂肪酶菌种库的建立

2.1.1 土样采集:为了分离得到产脂肪酶的菌株,采集植物油厂、肉联厂、乳品厂等处的含油土壤。

2.1.2 筛选分离:称土样 1g 于含 9mL 无菌水的三角瓶内,振荡得悬液,接种一环于试管中富集,50℃恒温水浴振荡培养 2d 后,按前法再富集一次,培养 2d,将产生混浊的试管稀释,涂布初筛平板,观察长出的菌落周围有无透明圈,因为透明圈的大小与菌株分解油脂的能力,即与产酶能力有一定关系,从而可将产酶菌株选出,用平板划线法分离纯种。

2.1.3 脂肪酶菌种库的初步建立:将 22 份不同来源的上样进行平板初筛后,得到 80 余株脂肪酶产生菌,其中细菌约 40 种,霉菌 20 种,酵母 10 余种。对其中的部分菌株进行了最适作用 pH 值、最适作用温度、热稳定性、pH 稳定性的实验。从结果可知,这些菌株有的耐高温,有的耐碱,也有的同时耐高温和耐碱,因而建立的是一个小型但比较有特色的菌种库(表 1)。

表1 部分菌株脂肪酶的一般酶学性质

编号	菌类	最适温度	最适 pH	酶活 (u/mL)
Y-1	酵母	40℃	8.0	20.6
M ₂	霉菌	50℃	8.0	15.0
S ₀	酵母	40℃	7.0	21.5
S ₁₁	酵母	35℃	7.0	14.2
S ₁₀	细菌	55℃	7.5	7.6
J8-2	霉菌	30℃	6.0	7.0
J ₈	细菌	45℃	9.0	6.0
1-11	细菌	45℃	10.0	6.7
U ₂	细菌	40℃	9.0	9.0

2.2 脂肪酶高产菌株诱变育种

2.2.1 出发菌株选定: 经过摇瓶复筛, Y-1 菌株酶活力最高, 作为进一步实验用菌。

2.2.2 诱变筛选: 按方法 1.4.2 对 Y-1 菌株进行复合诱变及初筛, 选取在平板上生长较快及透明圈较大的菌落, 经摇瓶筛选得到 7 株产酶能力较高的菌株, 随后对其中一株酶活较高的菌株 Y-11 进行产酶条件及酶学性质的初步研究。

2.2.3 变异菌株标记试验: 以制霉菌素、琥珀酸钠以及二者同时对突变株 Y-11 及野生株 Y-1 作试验, 比较生长及产酶受影响的程度。

实验结果证明突变株在对琥珀酸钠及制霉菌素的耐性上显著高于野生株, 其本身有着独特的抗性标记。

2.3 产脂肪酶菌株 Y-11 的鉴定

2.3.1 液体培养特征: 麦芽汁培养基 28℃ 静置培养 48h, 培养液较清, 液面上形成一层醭膜, 没有气泡不发酵。

2.3.2 菌落形态: 麦芽汁平板接种, 28℃, 7d, 菌落白色, 较大, 表面干燥, 有放射性菌丝线, 边缘呈细微毛边, 15d 后菌落长满平板。

2.3.3 个体形态: 马铃薯固体培养基划线接种后, 斜插入一盖片, 28℃ 培养 5d, 显微镜下观察盖片上菌丝形态, 有较长的真菌丝, 菌丝有隔膜, 在菌丝的末尾一端有许多横隔膜, 把菌丝切成条砖形, 断裂成单个细胞, 排列成一左倾—右倾的细胞断链, 即成节孢子, 亦有芽殖, 为多边芽殖。无八叠式细胞群。

2.3.4 孢子鉴定: 不形成子囊孢子, 不形成掷孢子, 也不形成冬孢子及担孢子, 显微镜下观察有大量节孢子, 也有少量厚壁孢子。节孢子经电镜观察大小为 20~70μm × 30μm。

由以上特征, 据《酵母菌分类学》(王利编, 1984 年版), 可知该菌为真菌门, 半知菌亚纲, 从梗孢目, 隐球酵母科, 丝孢酵母属 (*Trichosporon*)。

2.4 Y-11 菌株产酶条件的优化

2.4.1 碳源对产酶的影响: 以复筛培养基为基础, 改变碳源种类, 于 28℃, 摇瓶发酵 96h, 测定酶活。

Y-11 在不同种类的碳源培养基中, 产酶能力有很大差异。以蔗糖和可溶性淀粉为碳源时, 酶活可达 52 u/mL 和 55 u/mL, 而以葡萄糖为碳源时, 只能产生较低的酶活力。以往有人报道^[45]葡萄糖对诱导产生脂肪酶不利, 而本供试菌种以 0.5% 的葡萄糖作碳源时, 酶活也较高, 可以达到 42u/mL, 但比蔗糖、可溶性淀粉等碳源产生的脂肪酶活低, 并且当葡萄糖浓度提高到 1% 时, 酶活降至 18u/mL, 这说明可能也存在着一定的葡萄糖效应。

2.4.2 氮源对产酶的影响: 以黄豆粉和 (NH₄)₂SO₄ 作为复合氮源时, 效果最好, 可以达到 55u/mL; 仅以黄豆粉为氮源时, 次之; 以 NH₄Cl 为唯一氮源时, 酶活最低, 仅为 9u/mL。而且有机氮源比无机氮源更利于产酶。

2.4.3 金属离子对产酶的影响: Mg²⁺、Ca²⁺、K⁺、Fe²⁺ 有促进产酶的作用, 其中 Mg²⁺

的促进作用明显;而 Na^+ 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 有不同程度的抑制作用,尤以 Zn^{2+} 抑制作用最为明显,相对酶活仅为 13.5%。

2.4.4 培养温度及培养时间对产酶的影响: 分别在 25℃、26℃、27℃、28℃、29℃、30℃ 这 6 个温度下,对 Y-11 进行摇瓶发酵,并在不同时间定时取样,测其脂肪酶酶活,结果表明 28℃ 时酶活最高,而酶活随时间的变化规律是培养时间为 96h 时,酶活达到最高,超过 96h,酶活迅速下降。

2.4.5 培养起始 pH 对产酶的影响: 在 pH5~10 范围内,以 0.5 个 pH 为一个单位,进行摇瓶发酵,28℃ 下,96h 后,测酶活。结果表明,当培养起始 pH 为 6.0 时,酶活最高。

2.4.6 通气量对产酶的影响: 控制转速在 160r/min,使 300mL 摇瓶的装液量分别为 50mL、55mL、60mL、65mL、70mL、75mL、80mL、100mL,从测定结果可知装液量在 70mL~75mL 时,酶活最高。

2.5 Y-11 脂肪酶的酶学性质

2.5.1 酶作用的最适温度: 在 20℃~70℃,间隔为 5℃ 的不同温度下进行酶活测定,得到相同的酶液在不同的反应温度下所具有的酶活力单位。结果表明酶作用最适温度在 40℃~50℃ 之间,超过这一温度,酶活力迅速下降。

2.5.2 酶作用的最适 pH: 配制 11 种从 pH 5~10,间隔为 0.5pH 单位的缓冲液,按照酶活力测定方法,测得相同酶液在不同的 pH 条件下的酶活力单位。

此酶的最适作用 pH 值在 8.0~8.5 之间,在 pH9.0 时,仍能保持 60% 以上的酶活,故此酶为一碱性酶。

2.5.3 酶的热稳定性: 将此酶在 40℃、50℃、60℃、70℃ 水浴中分别保温 2h,每隔 15min 按前述方法测定酶活力,以不经处理的酶活力为 100%,其余所得酶活力折算成百分数,再对保温时间作图。可以看出,Y-11 脂肪酶在 40℃ 保温 2h,基本不失活,50℃ 保留酶活 61%,60℃ 时在 75min 后还有 50% 的酶活,70℃ 时保温 15min,酶活迅速下降到 60%,2h 后酶活存留 13%。这表明 Y-11 脂肪酶有一定的耐热性(图 1)。

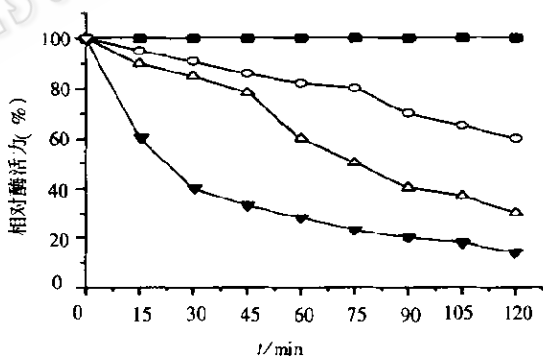


图 1 酶的热稳定性

—■—40℃, —○—50℃, —△—60℃, —▼—70℃

2.5.4 酶的 pH 稳定性: 取酶液与不同 pH 值 (pH5~10) 的缓冲液以 1:5 的比例混合,在 4℃ 时保温 48h,再将酶液调回到最适 pH,按标准酶活测定法测定酶活,以最适反应 pH 下保温所得的酶活力为 100%,其余折合成其剩余酶活力的百分数。结果表明此酶在 pH8~10 之间比较稳定。

2.6 Y-11 菌株的遗传稳定性试验

将 Y-11 进行连续 5 次传代试验,摇瓶发酵结果表明这株菌的酶活能够稳定在 50~55u/mL 之间,具有稳定的遗传性能。

3 讨论

供试菌株 Y-1, 经紫外线和亚硝酸复合诱变, 再以制霉菌素和琥珀酸钠筛选高渗透性和抗阻遏突变株, 酶活力提高了 155%, 抗性突变与 Y-11 菌株胞外酶产量之间的关系, 可能存在着与膜渗透性改变及解除阻遏相关的其他机理, 有待于进一步深入研究。传代考察酶的稳定性, 酶活性基本不变, 表明 Y-11 产酶稳定性良好; 对突变株的产酶条件和酶学性质进行了研究, 表明突变株 Y-11 产生的脂肪酶是一碱性酶, 并且在碱性 pH 一侧, 酶相当稳定, 在 60℃ 下保温 2h, 仍然存留 30% 的活力, 表明此脂肪酶有一定的耐热性。筛选到的另外一个菌株 M₂, 最适作用温度可以达到 50℃, 并且在 pH8 以上的环境中相当稳定。这些耐碱性脂肪酶在造纸、洗涤剂等行业中有着良好的应用前景。另外, 我们所建立的这个小型的菌种库包括了细菌、真菌以及酵母等众多类型的菌株, 由于不同菌株产生的脂肪酶具有不同的底物特异性, 因而在此基础上建立脂肪酶的底物特异性作用图谱, 对有特定类型的反应具有很大的参考意义, 这对于其多种用途的开发, 有很大的实用价值。

参考文献

- [1] Somkuti G, Babel F. J Appl Microbiol, 1968, 16: 617.
- [2] 张苓花, 王运吉. 生物技术, 1996, 6 (2): 20~22.
- [3] 陶文沂, 鄢显章, 向瑞春. 微生物学报, 1990, 30 (3): 216~222.
- [4] 李建武等编. 生物化学实验原理和方法. 北京: 北京大学出版社, 1994, 311~312.
- [5] 沈永强, 刘慈俊, 张景六. 微生物学报, 1974, 14 (1): 95~102.
- [6] 张苓花, 王运吉. 生物技术, 1996, 6 (1): 12~16.