

## 用快中子法选育细菌脂肪酶高产菌株\*

周延 张鹏 孟庆云 谭天伟

(北京化工大学生物化工系 北京 100029)

**摘要:**研究了从土壤中筛选产脂肪酶的菌株,利用紫外线、快中子、快中子和磁场复合、 $\gamma$ 射线、 $\gamma$ 射线和磁场复合诱变,以酶活为筛子进行诱变育种。结果,出发菌酶活较低的一株得到了一株酶活为 396.22U/mL 的诱变株,此酶活比出发菌株高 92 倍,并发现此菌对紫外线和快中子比较敏感;而出发菌酶活较高的一株得到了酶活为 424.60U/mL 发酵液的诱变株,此酶活为出发菌株 3.0 倍。在此基础上,初步探讨了快中子、 $\gamma$ 射线及磁场复合处理在产脂肪酶菌种诱变中的作用,并认为,在产脂肪酶菌株的诱变中快中子诱变更有效。

**关键词:**脂肪酶,菌种选育,快中子法诱变

**中图分类号:**Q93 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2001)02-0081-05

## BREEDING OF HIGH PRODUCING STRAIN OF LIPASE USING FAST NEUTRON

ZHOU Yan ZHANG Peng MENG Qing-Yun TAN Tina-Wei

(College of Biological Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029)

**Abstract:** Four methods of breeding high producing strain of Lipase are studied. As a result, the Lipase activity produced by one strain is 93 times as high as before, and the Lipase activity produced by another is 3.0 times. On these bases, the effects of four methods in breeding are discussed, and the using Fast Neutron is more effective method in breeding.

**Key words:** Lipase, Breeding of Strain, Fast Neutron

脂肪酶作为重要的工业用酶之一,在食品加工、洗涤、造纸、皮革加工等工业中被广泛应用<sup>[1]</sup>。近些年来,随着研究的深入,脂肪酶的应用领域也被不断扩展。特别是在油脂深加工和制药工业方面的研究进展迅速。利用脂肪酶高度立体选择性在制药工业中进行光学拆分合成手性药物,在化学工业中制备高光学纯手性化合物<sup>[2,3]</sup>,在油脂深加工中生产各种不饱和脂肪酸、三甘油酯、单甘油酯等成为研究的热点。

脂肪酶的来源主要有两种:从动植物组织中提取或用微生物发酵生产。由于微生物脂肪酶种类多,具有更广的作用 pH、作用温度范围和对底物的专一性类型,又便于进行工业生产和获得高纯度制剂,因而,微生物脂肪酶在酶理论研究及实际应用中具有更重要作用。目前常见的产脂肪酶的菌种选育方法主要是传统的化学诱变法(DES、LiCl、亚硝基胍、盐酸羟胺等)和紫

\* 国家自然科学基金资助项目(No. 29676001)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(No. 29676001)

收稿日期:2000-03-31,修回日期:2000-05-30

紫外线诱变法相结合<sup>[4-7]</sup>。

本研究旨在从土壤中筛选到脂肪酶的高产菌种,并对其进行紫外线、快中子、慢中子和磁场复合、 $\gamma$ 射线、 $\gamma$ 射线和磁场复合诱变,以酶活为筛子进行筛选,并初步探索快中子诱变、 $\gamma$ 射线诱变和磁场处理在产脂肪酶微生物筛选中的应用。

## 1 材料与方法

### 1.1 采样

从油脂加工厂、乳品厂及污水处理厂等处共采回土样 23 个。

### 1.2 培养基

液体富集培养基:橄榄油乳化液(含橄榄油 25%) 2.0g,酵母膏 0.3g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1g,  $\text{KCl}$  0.02g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02g, 水 100g。

平板分离培养基、斜面:液体富集培养基+2% 琼脂。

液体发酵培养基:橄榄油(PVA 乳化液,含橄榄油 25%) 0.2g,黄豆粉 2.0g,酵母膏 2.0g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05g,吐温-80 0.5g,水 100g (培养基 pH 值细菌为 7.5,霉菌为 6.5)。培养基在  $1 \times 10^5 \text{Pa}$ , 灭菌 20min。

### 1.3 试剂及原料

橄榄油,意大利原装进口;聚乙烯醇(PVA),平均聚合度  $1750 \pm 50$ ,北京新光化学试剂厂生产;对硝基苯酚月桂酸酯, SIGMA 试剂。其它试剂均为分析纯。

### 1.4 实验方法

1.4.1 酶活的测定:对硝基苯酚显色法(PNPL 法),酶活定义:IU 为  $37^\circ\text{C}$  pH8.5 下每分钟产生  $1\mu\text{mol}$  对硝基苯酚的酶量。以下简称 p-NPL 法<sup>[8]</sup>。

1.4.2 产脂肪酶菌株的分离、筛选:将土样用无离子水振散,吸取土壤悬浮液加入液体富集培养基,于  $37^\circ\text{C}$  摇床培养 72h。将富集培养液经适当稀释后,涂布于  $37^\circ\text{C}$  培养 72h,取单菌落接种斜面。挑取斜面种子接种液体发酵培养基,150r/min 摇床  $37^\circ\text{C}$  发酵 72h,发酵液于 4000r/min 离心 15min,取上清液测酶活进行筛选。

1.4.3 诱变处理:(1)紫外线诱变在诱变箱内进行。紫外线灯 15W,距离 20cm,诱变时间分别为 1.0min、1.5min、2.0min。(2)快中子诱变剂量分别为  $n_1=5$  千拉特、 $n_2=10$  千拉特、 $n_3=15$  千拉特。(3) $\gamma$ 射线诱变剂量分别为  $\gamma_1=5$  万伦琴、 $\gamma_2=10$  万伦琴、 $\gamma_3=15$  万伦琴。(4)为了增加诱变的突变率和正变率,又对经  $\gamma$ 射线和快中子辐射后的菌株进行磁场(ME)复合处理。(5)存活率、致死率、正变率计算方法如下:存活率=处理后孢子浓度(平均值)/处理前孢子浓度(平均值) $\times 100\%$ ;致死率=(1-存活率) $\times 100\%$ ;正变率=酶活发生正变的菌株数/总菌株数 $\times 100\%$ (注:本实验正变株是指酶活高于出发菌株的变异株)。

诱变后按 1.4.2 方法进行菌株的分离筛选,对酶活高的菌株进行传代稳定性实验,分别测各代液体发酵后上清液的酶活,检测其产酶稳定性。

## 2 结果与讨论

### 2.1 产酶菌种的初筛

将分离得到的产脂肪酶的菌株接入液体发酵培养基,发酵后上清液用 p-NPL 法测其酶活。共检测了 215 株菌,p-NPL 法酶活大多在 10U/mL 以下,只有 45 株酶活超过 10U/mL,其中最大的一株 Dc 酶活达 312.06U/mL。

### 2.2 诱变

为了考察 $\gamma$ 射线、快中子对菌种的诱变效果,我们选择了经过诱变(D1p)和未经过诱变(A<sub>51</sub>)菌株作为出发菌株。由于我们的最终目标是筛选到高产单甘酯转化活力脂肪酶的菌株,所以并没有单纯选择水解酶活最高的菌株进行诱变,而是选择了两株所产脂肪酶单甘酯转化活力较高的菌株。另外,在诱变处理后,为了增强诱变效果,提高正变率,又进行了加与不加磁场复合处理的比较。

**2.2.1 出发菌株酶活较低的细菌 D1p(酶活为 4.27U/mL)诱变:**D1p 的诱变系谱(UV 为紫外线,n 为快中子, $\gamma$  为 $\gamma$ 射线,ME 为磁场)如下。

(1)紫外线诱变:选取 D1p 为出发菌株(酶活力为 4.27U/mL),以紫外线诱变,照射时间为 1.0min、1.5min、2.0min,致死率分别为 93.8%、93.2%、97.0%,正变率分别为 93.75%、100%、100%。得到的最高酶活为 114.95U/mL(UV1.5<sup>2</sup>d),其酶活为出发菌株的 27 倍。由此可以看出紫外线的诱变效果很显著。是一种简便而有效的诱变方法。

(2)经紫外线诱变后的菌株 UV1.5<sup>2</sup>d 用 $\gamma$ 射线诱变:将紫外诱变后酶活最高的 UV1.5<sup>2</sup>d 再经 $\gamma$ 射线照射诱变。经 $\gamma$ 射线诱变未筛到发生正变的菌株。原因可能是由于 $\gamma$ 射线的致死率太高,各剂量致死率都在 98% 以上。但这也可能是由于 $\gamma$ 射线对菌株的选择性较大,这株菌不适合用 $\gamma$ 射线来照射诱变。

(3)经紫外线诱变后的菌株 UV1.5<sup>2</sup>d 用快中子诱变:将紫外诱变后酶活最高的 UV1.5<sup>2</sup>d 再经快中子诱变,经快中子诱变后致死率与正变率分别为 53.33%、54.55%,经快中子诱变后再用磁场复合处理的致死率与正变率分别为 19.17%、18.75%(酶活分布见图 1、图 2)。仅经快中子诱变最高酶活为 388.39U/mL(编号 B<sub>3n1b</sub>),经磁场复合处理后最高酶活为 396.22 U/mL(编

D1p  
(4.27U/mL)  
| UV  
UV1.5<sup>2</sup>d  
(114.95U/mL)

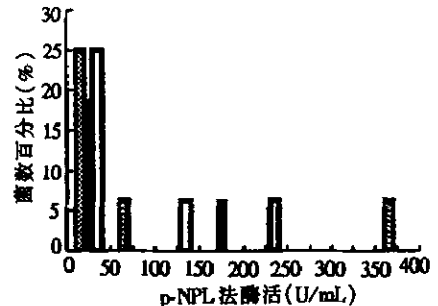
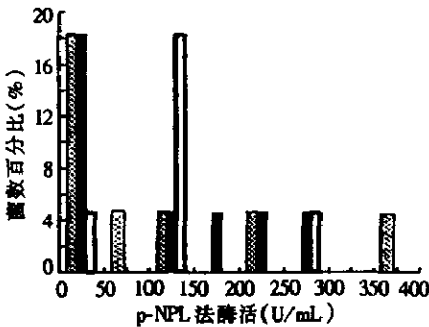
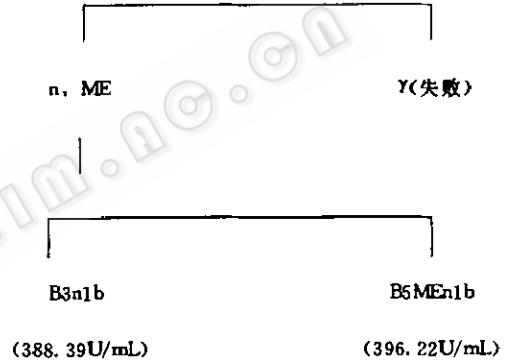


图1 UV1.5<sup>2</sup>d 经快中子诱变后酶活分布

图2 UV1.5<sup>2</sup>d 经快中子磁场复合诱变后酶活分布

□n1, ■n2, □n3

□n1ME, ■n2ME, □n3ME

号 B<sub>3</sub>ME<sub>n1</sub>b), 分别比 UV1.5'2d 菌株酶活提高 2.38 和 2.45 倍; 两者最高酶活相差 2%, 两者相差不大, 磁场后处理的效果并不显。(4)D1p 诱变后的酶活变化: 经紫外线诱变、快中子诱变及磁场复合处理最终酶活力比原出发菌酶活力提高 91.79 倍(酶活变化见图 3)。说明此产脂肪酶的菌株对紫外线和低剂量的快中子辐射相当敏感。当然, 这与初始酶活不高也有关系。

**2.2.2 出发菌株酶活较高的细菌 A<sub>51</sub>经 γ 射线诱变:** (1)选出初筛中酶活较高的 A<sub>51</sub>(p-NPL 法酶活 141.56U/mL), 未经紫外线诱变直接经 γ 射线诱变; γ 射线处理后致死率与正变率分别为 93.67%、14.29%, γ 射线与磁场复合诱变后致死率与正变率分别为 28.08%、12.50。仅经 γ 射线诱变最高酶活为 406.34U/mL(编号 A<sub>3</sub>γ<sub>3</sub>c), 经磁场复合处理后最高酶活为 424.34 U/mL(编号 A<sub>2</sub>MEY<sub>3</sub>a), 分别比出发菌株提高 1.87 和 2.00 倍, 两者最高酶活相差 4.43%。磁场处理效果较明显。(2)未经紫外线诱变的菌株 A<sub>51</sub>直接经快中子(n)诱变: 未经紫外线诱变的菌株 A<sub>51</sub>直接进行快中子(n)诱变: A<sub>51</sub>直接进行快中子诱变致死率与正变率分别为 67.33%和 36.84%, 经快中子诱变再用磁场复合处理后致死率与正变率分别为 87%和 47.62%(酶活分布见图 4, 图 5)。总的来说, 致死率较低, 且总体正变率较高, 仅经快中子诱变最高酶活为 386.85U/mL(编号 A<sub>2</sub>n<sub>3</sub>b), 经磁场复合处理后最高酶活为 424.60 U/mL(编号 A<sub>2</sub>ME<sub>n2</sub>C), 分别比出发菌株提高 1.73 和 2.00 倍; 两者最高酶活相差 9.75%。显然经磁场处理诱变效果较好。(3)通过比较 γ 射线和快中子的诱变结果可看出, γ 射线致死率高而正变率低, 快中子致死率较低而正变率较高, 但二者诱变达到的最高酶活基本相当。磁场后处理的作用在两种诱变中不尽一致(这可能与我们磁场处理后筛选量较少有关), 而从复合处理与否所得最高酶活的差别来看, 可以考虑适当使用磁场处理。

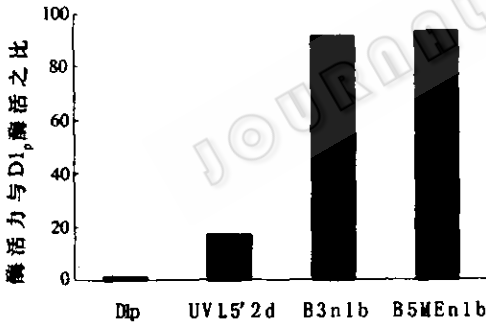


图 3 D1p 诱变后的酶活变化

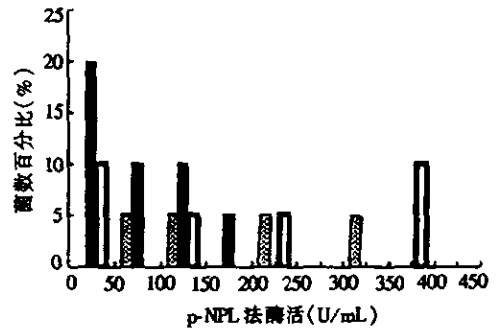


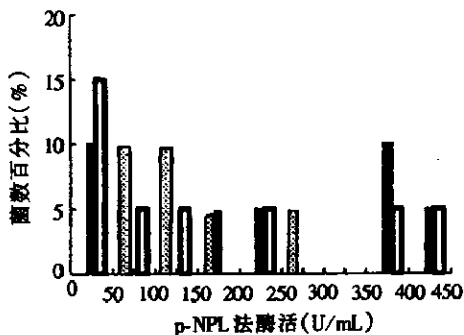
图 4 A<sub>51</sub>经快中子诱变后酶活分布

▨n1, ■n2, □n3

**2.2.3 诱变后菌种的传代稳定性结果:** 从传代稳定性实验数据来看(图 6), 所选 5 株菌中, 有 3 株稳定性较好, 第一代至第四代酶活均在一固定值范围附近, 且酶活较高。同一代中 3 个平行的酶活数据相差无几, 各代间酶活数据也相差不大。A5Y3a 和 A3MEY3c 产生了较大的回复突变, 二者均是经 γ 射线诱变的, 这一点值得注意。

### 3 讨论

本实验从土壤中筛选了产脂肪酶的野生菌, 并对其以较不常用的诱变方法——快中子和 γ 射线进行诱变, 并对其在产脂肪酶菌种中的作用进行了分析。

图5 A<sub>51</sub>经快中子诱变再经磁场复合处理后酶活分布

▨n1ME, ■n2ME, □n3ME

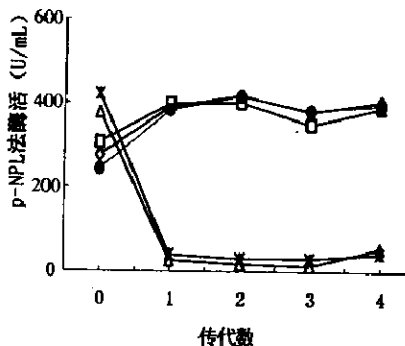


图6 传代后的 P-NPL 酶活变化

◇-B3n3c, □-A373b, △-A573a, \* -A3ME73c, ●-B2n2c

从诱变结果来看,菌株 D1p 对紫外线诱变比较敏感,而  $\gamma$  射线致死率较高,快中子诱变则相对温和些,磁场的作用在 D1p 诱变中作用不大,最高酶活为出发株的 93 倍。菌株 A<sub>51</sub> 的诱变中, $\gamma$  射线致死率高而正变率低,快中子致死率较低而正变率较高,但二者诱变达到的最高酶活基本相当,为出发菌株酶活的 3.0 倍。从诱变后所得最高酶活来看,可以考虑适当使用磁场处理。

传代实验说明,紫外线和快中子诱变产生回复突变的机率小些,而  $\gamma$  射线诱变则很容易产生回复突变。

综合二株菌的诱变来看,在产脂肪酶菌株的诱变中快中子诱变更有效, $\gamma$  射线可能不适用,磁场的作用则不明显。

## 参 考 文 献

- [1] 张树政编. 酶制剂工业(第一版). 北京: 科学出版社, 1984. 655~669.
- [2] 邢维梅. 微生物学通报, 1992, 19(5): 306~308.
- [3] 徐诗伟, 徐清. 微生物学通报, 1993, 20(4): 232~237.
- [4] 施巧琴, 李辉. 微生物学通报, 1982, 9(4): 162~164.
- [5] 黄建忠, 施巧琴, 郑毅, 等. 工业微生物, 1995, 25(3): 1~3.
- [6] 陶文沂, 邹显章, 向瑞春, 等. 微生物学报, 1990, 30(3): 216~222.
- [7] Motogasu O J, Ferment. Technol, 1986, 4(5): 363~371.
- [8] Winkler U K, Stuckmann M J. Bacteriol, 1979, 138: 663~670.