

假单胞菌 1299 产胆固醇酯酶的研究

1. 适宜的产酶条件

黄武华 方定一 崔玉兰 方一澄

(中国科学院微生物研究所, 北京)

摘要 从土壤中分离到一株产胞外胆固醇酯酶较高的假单胞菌。其适宜产酶条件: 油脂 0.75%, 尿素或 NaNO_3 0.2%, 酵母膏 0.5%, K_2HPO_4 0.2%, pH7.5, 28—30℃, 通气培养, 20 小时内酶活力可达 800—1500 u/L。

关键词 假单胞菌; 胆固醇酯酶

胆固醇酯酶是催化胆固醇酯水解成胆固醇和脂肪酸的一种酶。它是临床检测血清总胆固醇的重要酶之一。在 60 年代以前, Herader 等人^[1]从动物内脏提取出胆固醇酯酶, 并研究了其性质和作用机理。70 年代以后, 根据有关文献资料和专利报导, 能产胆固醇酯酶的微生物有: *Pseudomonas fluorescens*^[2], *Pseudomonas mendoquina*^[3], *Alcaligenes* sp.^[4], *Streptomyces lavendulae*^[5] 等。国内上海医药工业研究院也筛选到了产此酶的假单胞菌株^[6]。1986 年, 我们从土壤分离筛选到几株具有产胆固醇酯酶能力较高的菌种, 而以菌株 1299 产胞外胆固醇酯酶最高。我们对此菌株进行了鉴定和一系列产酶条件研究。本文报道研究的结果。

材料和方法

1. 菌种: *Pseudomonas* sp. 1299。

2. 培养基 (g/L): 豆饼粉 10, K_2HPO_4 2.0, NaCl 2.5, MgSO_4 0.6, 蛋白胨 5.0, 酵母膏 5.0, 油脂 7.5—10.0, pH7.2。

3. 培养条件: 30℃ 摇床(旋转式 200 r/min) 培养 20 小时左右。

4. 酶活测定: 改良的 Richmond 法^[7]。

5. 酶单位定义: 每分钟催化一微克分子胆固醇酯水解成胆固醇和脂肪酸所需的酶量为一个活力单位。

6. 主要试剂: 胆固醇油酸酯为美国 Sigma 公司产品, 纯度 99% 以上。胆固醇氧化酶由微生物所中试厂生产 (35—40 u/ml)。

结果和讨论

(一) 添加不同油脂对产酶的影响

利用 11 种油脂进行试验, 其浓度均为 1.0%。除了油脂 1 号、4 号、5 号试验, 接菌后培养 23 小时之外, 其余八种均培养 48 小时。结果表明, 产酶水平最高的是油脂 3 号和 4 号(表 1)。以下试验都是用油脂 3 号进行的。

(二) 油脂浓度对产酶的影响

培养基中除了油脂浓度改变之外, 其它成份不变。在 30℃ 摇床培养 21 小时, 结果见图

表 1 添加不同油脂对产酶的影响

油脂	无	豆油	花生油	玉米油	芝麻油	橄榄油	油酸	油 脂				
								1号	2号	3号	4号	5号
酶活 (u/L)	71.3	388	461	338	495	489	402	625	384	845	756	413

表2 添加各种维生素对产酶的影响

维生素及其浓度 (%)	无	B ₁ 0.02	B ₂ 0.005	复合维生素 B 0.01	菸酰胺 0.02	叶酸 0.001	生物素 0.001	酵母膏 0.5
酶活 u/L	701.6	868.0	850.0	826.0	985.5	838.0	841.0	1260
相对活力%	100	123.7	121.2	117.7	140.4	119.4	119.9	179.6

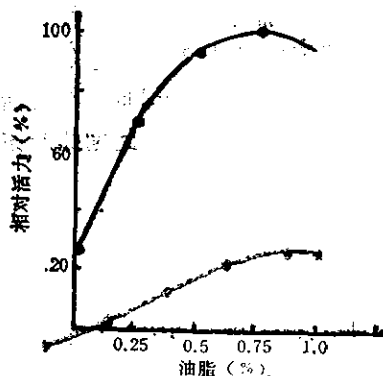


图1 油脂浓度对产酶影响

1. 无油脂时，酶活最低，相对活力只有24%。
油脂浓度为0.75%时酶活最高。

(三) 维生素种类对产酶的影响

表2列出的试验结果表明，各种维生素对产酶有不同程度的促进作用，尤其是酵母膏，可使酶活力有很大提高，其次是菸酰胺。

(四) 酵母膏浓度对产酶的影响

本试验中培养基除了酵母膏浓度改变之外，油脂浓度为1.0%，其它成份不变。试验结果表明(图2)，无酵母膏时，酶活力仅是最高水平的58%。酵母膏浓度增加到0.5%时，酶量达到最高，再增加其浓度，产酶也无增长趋势。酵母膏起着氮源和生长素的作用。

(五) 不同氮源对产酶的影响

用6种氮源进行试验，结果列于表3。表3中的对照除培养基中的豆饼粉外未加其他氮源。结果表明，有机氮源中以酵母膏最好，无机氮源中以尿素和NaNO₃最高。

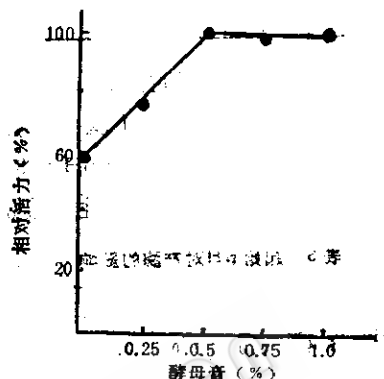


图2 酵母膏浓度对产酶的影响

(六) 某些碳水化合物对产酶的影响

用五种碳源进行比较试验。从表4列出的试验结果可看出，无油脂存在时，五种碳源的产酶水平极低，葡萄糖略高于其它四种碳源。在油脂存在时，产酶水平虽有显著提高，但这种提高并非是碳水化合物的作用，而是由于油脂被利用的结果。相反，由于碳水化合物(蔗糖除外)的存在，改变了代谢途径，使产酶水平有不同程度的下降。尤其是葡萄糖和淀粉使产酶下降更为明显，产酶水平仅是油脂对照的40%左右。由此可见，在1299菌产胆固醇酯酶发酵中不宜加入这些碳水化合物。

(七) 起始pH的影响

起始pH即指接种时的pH值。起始pH为5.4时，菌体不生长。pH为6.0时菌体能生长，但产酶较低，延长时间，产酶量有所提高。从表5可知，此菌株产酶的pH范围较广，但最适

表3 不同附加氮源对产酶的影响

氮源 (%)	对照	蛋白胨 0.5	玉米浆 1.0	酵母膏 0.5	尿素 0.2	NaNO ₃ 0.2	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.2
酶活 u/L	110	867	812	1244.7	1263	1296	686

表4 碳水化合物对产酶的影响

油脂	碳水化合物名称	对照	葡萄糖 1%	蔗糖 1%	甘油 1%	淀粉 1%	柠檬酸钠 1%
无油脂 (u/L)			327	185	228	227	102
加油脂 0.75% (u/L)		1601	652	1543	1495	666	1411

起始 pH 是 7.5。随着培养时间延长,发酵液的 pH 值也发生变化。但起始 pH 值愈高,这种变化愈小,或不发生变化。如起始 pH 为 8.5 时培养 23 小时后,发酵液 pH 也不发生改变。

表5 起始 pH 对产酶的影响

起始 pH		5.4	6.0	7.0	7.5	8.0	8.5
培养时间	酶活 (u/L)	未长	649.4	1092.9	1216.7	1164	1420
	发酵液 pH	5.4	7.0	8.0	8.2	8.2	8.5
23 小时	酶活 (u/L)	未长	920	970	1130	1096	1113.5
	发酵液 pH	5.4	7.0	8.2	8.2	8.2	8.5

(八) 培养温度对产酶的影响

将培养基中的蛋白胨改为 NaNO_3 , 酵母膏浓度为 0.25%, 其它成份不变。在四种温度下培养 16 小时和 22 小时, 观察酶活变化情况。从表 6 可知, 在 25℃ 下的产酶量比 28℃ 和 30℃ 时稍低些。随着时间加长, 25℃ 下的产酶量也有所增长, 而 37℃ 下则有一些下降。看来, 28—30℃ 为最适培养温度。

表6 温度对产酶的影响

温 度		25℃	28℃	30℃	37℃
酶活 (u/L)	16 小时	1204	1461	1532	1267
	22 小时	1319	1437	1449	1026

(九) 接种量对产酶的影响

以培养 14 小时的发酵液为种子, 接入不同量的种菌, 在 30℃ 摇床培养 21 小时。结果表明, 接种量为 6% 时较适宜, 提高接种量, 活力也未见提高。

(十) 通气量对产酶的影响

在 250ml 摇瓶中装不同量的培养基, 接种量为 5%, 30℃ 摇床培养 19 小时。从图 3 可看出, 培养基装量超过 20ml 时, 酶活随装液量的增加而逐渐降低, 到 60ml 时, 相对活力只有 20ml 体积时的 70%。可见此菌株产该酶需较多的通气量。

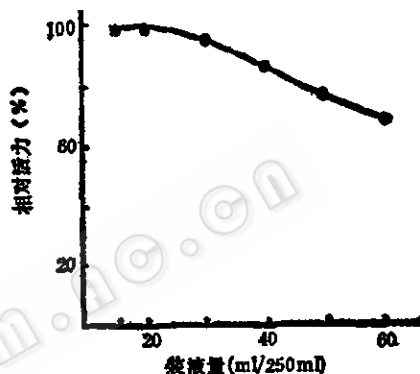


图3 通气量对产酶的影响

(十一) 消泡剂种类及浓度对产酶的影响

在发酵过程中, 发酵液产生一定的泡沫, 需添加消泡剂。试验了两种消泡剂的不同浓度(表

表7 消泡剂对产酶的影响

甘油聚醚	浓度	0	1.4/万	4.9/万	9.8/万	14/万
	酶活 (u/L)	1087	1133	1059	833	715
	相对活力 (%)	100	104.2	97.4	76.6	65.78
泡敌	浓度	0	1.75/万	4.4/万	10.5/万	15.7/万
	酶活 (u/L)	1087	1156	981	624	594
	相对活力 (%)	100	106.3	90.2	57.4	54.6

7)。在低浓度下(1—4/万), 这两种消泡剂对产酶无明显抑制作用, 但随着浓度提高, 抑制作用逐渐增大, 尤其是泡敌。

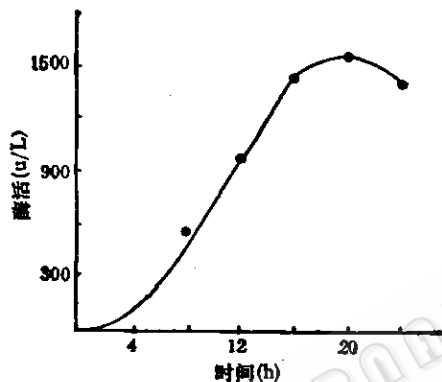


图4 产酶时间

(十二) 产酶时间

以上述最佳条件进行产酶时间考察。正如

图4所示,产酶时间主要是在8—20小时之间,超过20小时酶活略有下降。因为此时的油脂已基本耗完, pH 已由原来的7.5升到8.2。因此以在16—20小时时提酶为宜。

参 考 文 献

- [1] Herandez, H. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 228: 447, 1957.
- [2] Takayuki Uwajima et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 39(7): 1511—1512, 1975.
- [3] SU, 966115, 1983.
- [4] UB, 1571877, 1980.
- [5] JP. 公开特许, 昭 53—109992, 1977.
- [6] 杨光礼等: 医药工业, 18(3), 112—115, 1987.
- [7] Richmond, W.: *Clin. Chem.*, 19(2): 1350—1356, 1973.