

液化沙雷氏菌胞外脂肪酶产生条件的研究

刘 慧 邹文欣 郁文焕

(南京大学生物科学与技术系, 南京 210093)

摘要 新分离的一株液化沙雷氏菌 (*Serratia liquefaciens*) 能产生大量胞外碱性脂肪酶, 本文在摇瓶发酵水平上考察了培养基组成、培养条件等因素对其生成脂肪酶的影响。在优选条件下, 即培养基组成为(%)玉米油 1.25, 豆饼粉 2.0, 蛋白胨 1.0, 酵母膏 0.2, K_2HPO_4 0.2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1, 初始 pH 为 7.25 时, 28℃, 150r/min 旋转摇床振荡培养 40h, 该菌株的发酵液酶活达到 43u/ml, 比优化前产酶量 (17u/ml) 提高近两倍。关于液化沙雷氏菌胞外脂肪酶的研究, 国内外目前均未见报道。

关键词 液化沙雷氏菌, 脂肪酶, 产酶条件

80 年代起, 由于发现脂肪酶在不含水的有机溶剂系统中具有催化活性, 许多脂肪酶独特的潜在工业应用被认识^[1,2], 国际上兴起了一个空前的脂肪酶研究热潮, 国内也陆续有不少产酶菌种的研究报道^[3-6]。我们从学校食堂污物中分离到一株高产胞外碱性脂肪酶的细菌, 经中国科学院微生物研究所鉴定确认为液化沙雷氏菌(另文发表), 并对其进行了深入研究。本文报道有关其产酶条件的初步研究结果。

1 材料与方法

1.1 菌种

液化沙雷氏菌 (*Serratia liquefaciens*) S33DB-1, 本实验室分离保存。

1.2 摇瓶发酵培养基(%)

可溶性淀粉 1.0, 豆饼粉 2.0, 蛋白胨 1.0, 酵母膏 0.2, K_2HPO_4 0.2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1, 橄榄油 0.25, 以 Na_2CO_3 调 pH 至 8.0, 250ml 三角瓶每瓶装 25ml, 120℃ 灭菌 15min。

1.3 脂肪酶活力测定

底物及缓冲系统: 化学纯橄榄油与 2% 聚乙烯醇 (PVA) 以 1:3(V/V) 比例混合, 用高速分散器搅动 3min, 使成乳白色均匀分散稳定的乳化液, 4℃ 冰箱贮存, 使用前需重新乳化。缓冲系统采用 0.05mol/L pH 8.0 的 Tris

缓冲液。

测定方法: 取 100ml 三角瓶, 加入 4ml 底物乳化液和 5ml 缓冲液, 混合均匀, 放进 40℃ 恒温水浴中预热 10min, 加入 1ml 待测样品液, 迅速摇匀保温并记时, 反应 15min 后立即加入 95% 乙醇 15ml 终止酶作用, 再加 1% 酚酞指示剂 2 滴, 用经过标定的 0.05mol/L NaOH 溶液滴定至微红色出现, 记录耗碱量。对照样品先经乙醇灭活酶后同样处理。

酶活计算: 在 40℃、pH8.0 的条件下, 每分钟分解脂肪产生 1μmol 游离脂肪酸所需要的酶量, 定义为 1 个脂肪酶活力单位。样品酶活可由下式计算:

$$\text{酶活力 (u/ml)} = \frac{A-B}{t} \times n \times 50$$

式中 A 为样品耗碱量, B 为对照样品耗碱量, t 为反应时间, n 为样品的稀释倍数。

1.4 生物量测定

发酵液中生物量采用细胞湿重, 以 mg/ml 表示。

1.5 pH 值测定

发酵液 pH 值采用 DRION RESEARCH Model 211 digital pH meter 测定。

1994-12-29 收稿

2 结果与讨论

2.1 培养时间对产酶的影响

发酵培养基 28℃、150r/min 振荡培养, 测定不同时间发酵液中脂肪酶活力, 结果如图 1。

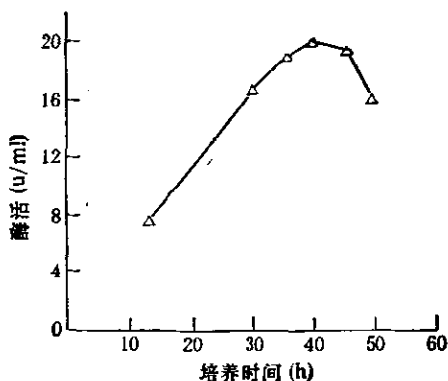


图1 培养时间与产酶的关系

S33DB-1 在培养的早期阶段就开始产生脂肪酶, 培养 35—45h 是产酶的活跃时期, 延长发酵时间, 酶活即呈下降趋势。

2.2 初始 pH 对产酶的影响

用盐酸和 Na_2CO_3 调培养基的初始 pH 在 6.5—9.0 范围, 培养 40h, 测酶活和生物量。从表 1 可看出, 初始 pH 对产酶影响较大, pH 7.25—7.5 对产酶有利, 可能是细菌在微碱性条件下菌体生长旺盛的缘故。

表1 初始 pH 对产酶和菌体生长的影响

| 初始 pH 值 | 6.5 | 7.0 | 7.25 | 7.5 | 8.0 | 8.5 | 9.0 |
|-------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 酶活力 (u/ml) | 1.67 | 6.73 | 22.67 | 20.47 | 13.33 | 10.23 | 7.71 |
| 生物量 (mg/ml) | 67.3 | 139.5 | 145.5 | 140.2 | 124.7 | 126.2 | 100.0 |
| 终 pH | 6.3 | 6.6 | 7.0 | 7.3 | 7.8 | 8.4 | 8.8 |

2.3 通气量对产酶的影响

摇瓶装液量和摇床转速是控制培养液中通气量的两个主要因素, 常用来反映氧气对微生物生长和产酶的影响。

培养基初始 pH 7.25, 接种量 2%, 28℃、150 r/min 培养 40h, 测定不同装液量组的平均酶活, 结果如图 2。表明装液量为 25ml (250ml 三

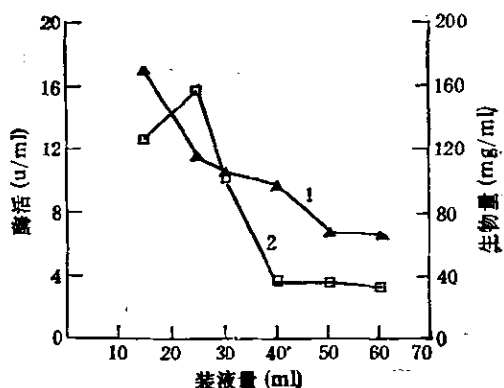


图2 装液量对产酶及菌体生长的影响

1. 生物量, 2. 酶活

角瓶) 时产酶最高, 增大装液量造成溶氧降低, 菌体生长变弱, 产酶也急剧下降。

培养基同上, 装液量为 25ml, 在不同转速的摇床上振荡培养 40h, 测酶活。实验结果表明摇床转速为 150r/min 时较适于产酶, 过大或过小均不利于产酶。

2.4 培养温度对产酶的影响

培养基初始 pH 7.25, 装液量 25ml, 在 26℃、28℃、30℃ 和 32℃ 四个摇床上培养 40h, 摇床速度均为 150r/min。结果发现 28℃ 较适于产酶。

2.5 接种量对产酶的影响

将培养 20h 的种子, 分别按 2%、5%、10% 及 20% (V/V) 的接种量接入发酵培养基中, 其余条件同上, 40h 后测定酶活, 结果见表 2。接种量在 2%—10% 范围内对产酶影响不大, 而 20% 接种量产酶反而下降。2% 接种量就能达到大量产酶目的, 说明 S33DB-1 有利于生产应用。

表2 接种量对产酶的影响

| 接种量 (V/V) | 2% | 5% | 10% | 20% |
|------------|-------|-------|-------|------|
| 酶活力 (u/ml) | 20.53 | 17.57 | 19.67 | 14.0 |

2.6 碳源对产酶的影响

2.6.1 糖质碳源: 以发酵培养基为基础, 由不同碳源物质代替其中的可溶性淀粉, 观察它们

表 3 糖质碳源对产酶和菌体生长的影响

| 碳源 | 浓度 (%) | 发酵液酶活 (u/ml) | 生物量 (mg/ml) |
|-------|--------|--------------|-------------|
| 可溶性淀粉 | 1 | 10.33 | 102.8 |
| | 2 | 7.33 | 155.4 |
| | 3 | 6.33 | 181.2 |
| 玉米粉 | 1 | 17.83 | 189.4 |
| | 2 | 10.07 | 269.1 |
| | 3 | 5.0 | 384.5 |
| 蔗糖 | 1 | 2.13 | 95.6 |
| | 2 | 5.5 | 60.2 |
| | 3 | 1.67 | 60.9 |
| 葡萄糖 | 1 | 1.63 | 111.2 |
| | 2 | 1.0 | 102.0 |
| | 3 | 0 | 110.4 |

对菌生长和产酶的影响。

从表 3 可以看出玉米粉结果最好,生物量和产酶均很高。各种碳源物质都是以低浓度的(1%) 结果为好。

2.6.2 油脂:培养基不加碳水化合物,而用不同的油脂作产酶试验。不加油时,几乎不产酶;菌株只有在含油培养基中才能产生脂肪酶,可以推断此菌株脂肪酶的合成属诱导型,而且油脂可以作为单一碳源被利用。不同油脂的作用效果不同,玉米油的效果最好,其次是鱼油、豆油、棉清油,菜油和色拉油较差(表 4)。

由于玉米油的效果特别好,我们又试验了其不同浓度对产酶的影响(表 5)。结果表明,酶量的上升在一定范围内依赖于加入的油量,以 1.25% 的浓度为好。油量继续增加,产酶量反而有所下降。

2.7 氮源对产酶的影响

在发酵上复合氮源一般具有很多优越性,而豆饼粉是工业大规模生产时有效而廉价的氮源物料之一,作为初步研究,我们选择豆饼粉作为固定氮源,考察其它氮源与之复合的效果。从表 6 结果可看到,无机氮源的表现不如有机氮源。牛肉膏和蛋白胨对产酶都有利,从成本考虑,选用蛋白胨与豆饼粉复合较适宜。

2.8 无机盐类对产酶的影响

我们试验了 8 种无机盐类对产酶的影响,

表 4 油脂对产酶及菌体生长的影响

| 油脂 | 浓度 (%) | 酶活 (u/ml) | 生物量 (mg/ml) | 相对酶活 (%) |
|-----|--------|-----------|-------------|----------|
| 不加油 | 0 | 1.67 | 93.7 | 4.5 |
| 橄榄油 | 0.5 | 9.37 | 65.0 | 43 |
| | 1.0 | 15.67 | 48.2 | |
| 鱼油 | 0.5 | 18.27 | 66.6 | 70 |
| | 1.0 | 25.5 | 79.1 | |
| 菜油 | 0.5 | 3.83 | 70.0 | 14 |
| | 1.0 | 5.1 | 56.5 | |
| 色拉油 | 0.5 | 2.67 | 62.9 | 10 |
| | 1.0 | 3.67 | 79.8 | |
| 麻油 | 0.5 | 8.03 | 87.0 | 32 |
| | 1.0 | 11.63 | 139.8 | |
| 玉米油 | 0.5 | 12 | 77.1 | 100 |
| | 1.0 | 36.67 | 117.8 | |
| 豆油 | 0.5 | 17.6 | 139.3 | 58 |
| | 1.0 | 21.23 | 126.3 | |
| 花生油 | 0.5 | 10.33 | 112.0 | 25 |
| | 1.0 | 9.33 | 92.5 | |
| 棉清油 | 0.5 | 18.8 | 118.1 | 55 |
| | 1.0 | 20.33 | 124.9 | |
| 猪油 | 1.0 | 10.33 | 80.3 | 28 |

表 5 玉米油浓度与酶产量的关系

| 玉米油浓度 (%) | 0 | 0.5 | 1.0 | 1.25 | 1.5 | 1.75 | 2.0 |
|-----------|---|-----|------|------|-----|------|-----|
| 酶活 (u/ml) | 0 | 7 | 32.7 | 43 | 34 | 28 | 27 |

结果如表 7。发现一定浓度的 Mg^{2+} , K^{+} , Ca^{2+} 对产酶有促进作用, Fe^{2+} 无影响,其它均抑制脂肪酶的产生。这与朱明华等^[7]在假单胞菌中的结果相类似。另外,金属离子螯合剂 EDTA 的加入,可完全抑制产酶。

2.9 吐温和液体石蜡的影响

有报道吐温和液体石蜡可以促进某些菌的脂肪酶产生^[7,8]。我们试验了吐温 20、吐温 80 和液体石蜡对 S33DB-1 产酶的影响,发现吐温严重抑制液化沙雷氏菌脂肪酶的产生,而液体石蜡的促进作用也不明显。

综合以上培养基成分及发酵条件等因素的摸索试验,初步确定液化沙雷氏菌 S33DB-1 的较适产酶条件为(%): 豆饼粉 2.0,蛋白胨 1.0,玉米油 1.25,酵母膏 0.2, K_2HPO_4 0.2, $MgSO_4 \cdot$

表 6 氮源对产酶及菌体生长的影响

| 氮 源 | 浓度 (%) | 酶活 (u/ml) | 生物量 (mg/ml) |
|-------|--------|-----------|-------------|
| 不另加氮源 | 0 | 6.93 | 66.1 |
| 牛肉膏 | 0.5 | 15.33 | 106.5 |
| | 1 | 21.13 | 80.0 |
| | 1.5 | 20.47 | 64.6 |
| | | | |
| 蛋白胨 | 0.5 | 11.33 | 191.2 |
| | 1 | 28 | 159.7 |
| | 1.5 | 25 | 138.1 |
| | | | |
| 酵母粉 | 0.5 | 7.4 | 95.9 |
| | 1 | 6.03 | 71.8 |
| | 1.5 | 10.03 | 125.5 |
| | | | |
| 氯化铵 | 0.5 | 5.1 | 61.1 |
| | 1 | 13.77 | 60.3 |
| | 1.5 | 18.03 | 59.9 |
| | | | |
| 硫酸铵 | 0.5 | 3.83 | 87.1 |
| | 1 | 9.7 | 67.7 |
| | 1.5 | 14.97 | 71 |
| | | | |
| 尿素 | 0.5 | 13.33 | 84.9 |
| | 1 | 13.5 | 73.2 |
| | 1.5 | 6.37 | 75.9 |
| | | | |

7H₂O 0.1, pH7.25; 装液量 25ml (每 250ml 三角瓶), 28℃, 150r/mni 摇床振荡培养 40h。在此条件下, 发酵液酶活达 43u/ml, 比原来提高近 2 倍。

表 7 无机盐对产酶的影响

| 金属盐* | 相对酶活 (%) |
|---|----------|
| None | 100 |
| K ₂ HPO ₄ | 153 |
| MgSO ₄ | 145 |
| CaCl ₂ | 137 |
| FeSO ₄ | 105 |
| MnSO ₄ | 58 |
| Fe ₂ (SO ₄) ₃ | 33 |
| ZnSO ₄ | 27 |
| CuSO ₄ | 25 |
| EDTA | 0 |

* 注: 各种金属盐浓度为 0.1%、EDTA 0.5%

参 考 文 献

- [1] Harwood J. Trends Biochem Sci, 1989, 14:125—126.
- [2] Björkling F, Godtfredsen S E, Kirk O. TIBTECH, 1991, 9:360—363.
- [3] 施巧琴. 微生物学通报, 1981, 8(3): 108—110.
- [4] 谢舜珍, 吴琼发, 徐家立. 微生物学报, 1986, 26(3): 260—264.
- [5] 王美英, 徐家立. 微生物学报, 1989, 29(1): 1—6.
- [6] 施巧琴, 陈若莹, 许晴怡, 等. 微生物学报, 1992, 32(6): 425—431.
- [7] 朱明华, 李祖义, 杜彬, 等. 微生物学报, 1991, 31(1): 48—53.
- [8] Nahas E. J Gen Microbiol, 1988, 134:227—233.

STUDIES ON THE EXTRACELLULAR LIPASE PRODUCTION OF *SERRATIA LIQUEFACIENS*

Liu Hui Zou Wenxin Yu Wenhuan

(Department of Biological Science and Technology, Nanjing University, Nanjing 210093)

Abstract *Serratia liquefaciens* strain S33DB-1 was capable of producing large amount of extracellular alkaline lipase under the inducement of oils. Factors affecting the lipase production were investigated in shaken-flask level. Obtained results showed that the optimum medium composition and cultural conditions were(%): Bean cake meal 2.0, Corn oil 1.25, Peptone 1.0, Yeast extract 0.2, K₂HPO₄ 0.2, MgSO₄ · 7H₂O 0.1, pH7.25, and 28℃, 25ml medium in a 250ml flask, 150r/min shaking for 40h. Under such conditions, the lipase activity in culture supernatant was 43u/ml, as 2 times high as the original one.

Key words *Serratia liquefaciens*, Lipase, Productive conditions