

文章编号 :1009-038X(2000)01-0041-04

从非洲土壤中分离新的产生脂肪酶的细菌*

Frederic Marie Tavea , 章克昌
(无锡轻工大学生物工程学院 ,江苏无锡 214036)

摘 要 :从采自非洲 喀麦隆和加纳)的 33 个土样中分离得到的产生脂肪酶的细菌 H-1 ,初步鉴定为假单胞菌属 .以菌株 H-1 为出发菌株 ,经紫外线照射和亚硝基胍处理 ,得诱变菌株 H-58 ,其脂肪酶产生能力达 40 U/mL .对菌株 H-58 进行生产能力的稳定性试验 ,结果良好 .连续传代 5 次能保持良好的产脂肪性能 .
关键词 :细菌 ;脂肪酶 ;分离
中图分类号 :Q556 **文献标识码 :** A

Isolation of New Lipase Producing Bacterium from Soil Samples

Frederic Marie Tavea , ZHANG Ke-chang
(School of Biotechnology , Wuxi University of Light Industry , Wuxi 214036)

Abstract : Out of 33 soil samples collected around africa (CANEROON and GHANA) , a potent bacterium for lipase production (strain H-1) was isolated and identified as *Pseudomonas* species . Strain H-1 , was then treated by ultraviolet (UV) irradiation and nitrosoguanidine (NTG) , a mutant H58 was obtained with a lipase productivity around 40 U/mL . Strain H58 was tested for its productive stability . The results were positive , since it maintained the high lipase productivity for 5 successive generations .
Key words : bacterium ; lipase ; isolation

近年来 ,脂肪酶(acylglycerol acylhydrolas ,EC 3.1.1.3)在工业应用方面得到了很大重视^[1,2] ,例如 ,可以用它来改变甘油三酯 ,合成各种酯类化合物以及用于家庭洗涤剂^[3,5] .许多脂肪酶已经商业化生产 ,其产生菌主要是霉菌和细菌 .已经公布的适用于甘油三酯加工的不同来源的脂肪酶有 33 种 ,其中 18 种来自霉菌 ,7 种来自细菌^[5] .
与其它的水解酶 ,如蛋白酶和淀粉酶相比 ,脂

肪酶在工业上的重要性至今还比较小 ,其原因部分是因为直到 10 年前 ,脂肪酶在工业上很少找到重要的应用领域 ,另外 ,工业规模地大量生产脂肪酶在工艺上还有困难 ,也很昂贵^[6~8] .虽然很容易找到脂肪酶产生菌 ,但其产率往往是低的 .通过经典的诱变和发酵工艺的改进来提高产率的报道非常少 .
低分子量的酯类是香味的一个重要类别 ,它们

* 收稿日期 :1999-04-06 ;修订日期 :1999-10-10 .
作者简介 : Frederic Marie Tavea (1967 年 9 月生) ,男 ,喀麦隆人 ,工学博士 .

中的大多数是许多食品和香料中水果香味的代表性组成. 分离新的脂肪酶产生菌, 可用于进一步研究在有机溶剂中低分子量酯类的合成, 作者选择了假单胞菌属的细菌, 因为有一些研究工作者报道说, 这类菌在有机催化反应中表现良好的多面性, 反应性和稳定性^[9,10].

1 材料与方法

1.1 材料

聚乙烯醇(PVA, 聚合度 1750 ± 50), 上海石油化工废水处理厂生产;

亚硝基胍(NTG), 瑞典 Fluka 公司产品;

若丹明 B 和 *p*-硝基苯棕榈酸盐, Sigma 公司产品;

豆饼粉和玉米浆, 无锡酶制剂厂提供;

1.2 方法

1.2.1 产脂肪酶微生物的富集 1 g 土样悬浮在 10 mL 0.7 g/dL 的 NaCl 溶液中. 摇匀后取出 0.1 mL 悬浮液, 加入含有丰富培养基的试管中. 培养基的组成(g/dL): 橄榄油 2, 酵母膏 0.02, Na_2HPO_4 0.35, KH_2PO_4 0.15, MgSO_4 0.05, NaCl 0.05, 起始 pH 值为 7.5. 试管放在培养箱中保温 30 °C, 150 r/min, 摇瓶, 培养 2~4 d, 然后取 5 mL 培养液移入另一支装有相同培养基的试管中, 在相同的条件下重复培养一次. 用橄榄油作为碳源是基于以下设想, 即能利用油脂的微生物一般能产生脂肪酶, 而较高的培养 pH 值是因为它适宜细菌的生长.

1.2.2 产脂肪酶微生物的分离和筛选 在丰富培养基上长出的微生物用营养平板进行分离(图 1), 后者含 0.1% 的中性若丹明 B 的无水酒精溶液. 产脂肪酶的微生物生成的菌落周围在紫外灯下有红色荧光环. 挑选光环大的菌落进行摇瓶发酵, 筛选产酶能力强的菌株.

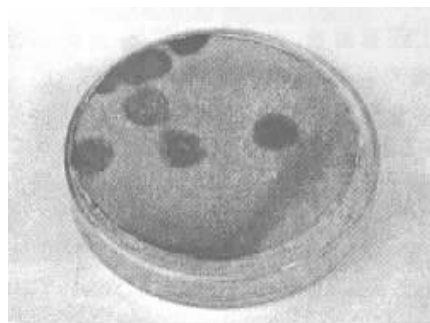


图 1 用来分离脂肪酶产生菌的若丹明平板

Fig.1 Rhodamine B plate for isolation of lipase producing bacteria

1.2.3 脂肪酶发酵 从若丹明平板上挑选到的菌株生长在斜面试管上, 斜面培养基的组成(g/dL): 橄榄油 2, NaCl 0.5, 蛋白胨 1, 牛肉膏 0.5, 琼脂 1.5.

保温培养 2 d. 从斜面上挑取一环细菌, 接入装有 30 mL 发酵培养基的容积为 250 mL 三角瓶中, 发酵培养基的组成(g/dL): 橄榄油 2, 豆饼 2, 玉米浆 2, NaNO_3 0.3, 起始 pH 值为 8.5~9.0. 接种后保温培养 72 h.

1.2.4 脂肪酶活性测定

1) 平板法(脂肪酶活性快速评估法) 平板中装入以下组成的固体培养基: 1.5% 琼脂, 10% 脂肪酶基质(25 mL 橄榄油, 75 mL 4% 的聚乙烯醇, 20 000 r/min 条件下均质 10 min, 90% 0.5 mol/L 的 NaOH-甘氨酸溶液, pH 值为 9.0 的 0.1% 若丹明 B 溶液. 在该固体培养基上正确地打上一些直径 4 mm 的孔(图 2), 往这些孔中加入 25 μL 发酵液上清液(发酵液 8 000 r/min 离心 10 min). 平板在 40 °C 保温培养 24 h, 在 UV 光下检查孔周围红色荧光环的大小, 环大者表示产生脂肪酶能力高.

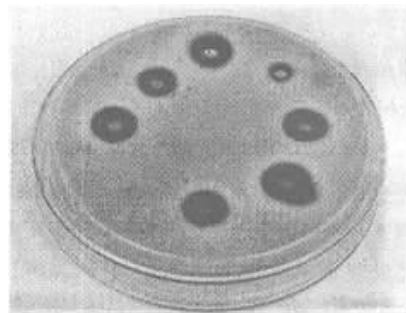


图 2 快速检测脂肪酶活力的若丹明平板

Fig.2 Rhodamine plates for rapid appraisal of lipase activities

2) 分光光度测定法 生色基质已被成功地应用于脂肪酶测定中^[12,15,16]. 溶液 A: 90 mg *p*-棕榈酸硝基苯脂溶于 30 mL 异丙醇中. 溶液 B: 450 mL 50 mol/L tris-HCl 缓冲液, 并含有 2 g 三硝基甲苯 X-100 和 0.5 g 阿拉伯胶. 0.9 mL 基质溶液(由溶液 A 和溶液 B 按 1:9 比例, 缓慢混合, 新鲜配制而成, 该溶液至少可稳定 2 h 在 47 °C 预培养, 然后加入 0.1 mL 稀释至一定程度和粗酶液, 继续在 47 °C 保温 10 min. 然后, 用分光光度计测定溶液中已释放 *p*-硝基酚的数量(以不加酶的溶液作对照). 脂肪酶 1 个单位的定义是: 每分钟释放 1 μmol *p*-硝基酚所需的酶量(标准曲线制作时以 *p*-硝基酚为标准品).

3) 标准方法^[11]:人们经常用标准法来测定脂肪酶的活力.这里的反应混合物组成是:4 mL 上述脂肪酶基质溶液,5 mL 0.05 mol/L 甘氨酸缓冲液,pH 值为 9.0 的 1 mL 制备好的稀释样品,混合溶液保温 40 ℃ 15 min.加 15 mL 无水酒精中止反应.然后用 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液通过滴定来测定已释放的脂肪酸量.一个单位脂肪酶的定义是:每分钟释放 1 μ mol 脂肪酸所需脂肪酶的数量.

1.2.5 分类研究 分离得到的菌种采用 Lizuka 和 Komagata^[12]叙述的方法,并参考 Bergey 的细菌分类手册进行初步鉴定.

1.2.6 微生物的诱变

1) 紫外线照射:4 mL 处于对数生长期(培养 12 h)的悬浮菌液(1 $\times$ 10⁸ 个/mL)置于平板中,用紫外线灯(15W,2 537 nm)照射,间距为 15~30 cm.照射时间分别为 30 s,60 s,90 s,2 min,3 min,5 min.在照射过程中细胞浮液用磁力搅拌进行混合.样品的致死率>90%.照射后的菌液进行分离.

2) NTG 处理:1 mL NTG(200 μ g/mL 和 0.1 mol/L pH 值为 6.0 的磷酸缓冲液)加入到 1 mL 上述细胞悬浮液中.30 ℃ 摇床培养(180 r/min),时间分别为 30,60,90,120 min.到处理时间,立即加 1 000 倍体积的蒸馏水稀释,中止反应.对致死率为 90% 的样品进行分离.

2 结果和讨论

2.1 产脂肪酶微生物的分离

众所周知,选育脂肪酶产生菌通常并不是一件十分困难的事,因为这类菌的分布是很广泛的.但是,要找到一株脂肪酶活力很高的菌株是困难的.作者从 33 个在非洲采集到的土样中分离得到 150 个脂肪酶产生菌,测定了它们的酶活并将它们分成 3 组(见表 1).第一组是产酶活力低的菌,其酶活在 2 μ /mL 以下,共有 15 株.第二组的菌株数量最多,共有 115 株,它们的产酶活力在 2~5 U/mL 之间.最后一组的产酶活力最高,均高于 5 U/mL(图 3).其中产酶活力最高的菌株是 H-1.所以我们取 H-1 作为进一步研究的出发菌株.后续的发酵研究表明,其发酵产酶能力达 13 U/mL.

2.2 菌株 H-1 的鉴定

菌株 H-1 的分类学特性如下:

1) 形态学特性 杆状 0.8 μ m $\times$ 1.6 μ m,圆形末端,单个或成双.无孢子,格兰阴性运动,有两根鞭毛.

万方数据

表 1 从 33 个土样中分离脂肪酶产生菌
Tab.1 Screening of lipase producers from 33 soil samples

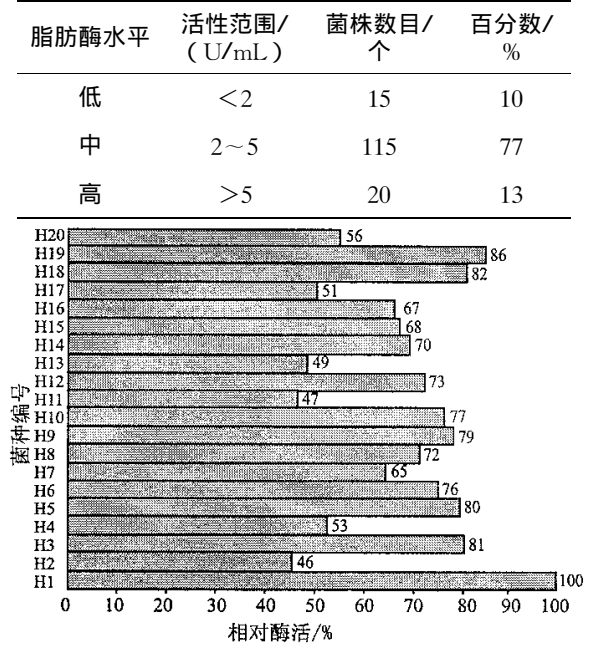


图 3 分离到一些脂肪酶产生菌株

Fig.3 Isolated lipase producers

2) 培养特性 营养琼脂菌落:圆形,平滑,突起,完整,半透明,黄棕色.

营养琼脂斜面:完整,纤维状,平滑,扁平,反光,有光泽,黄棕色,不透明.

明胶穿刺 适度生长,暗棕色薄膜,无液化.

营养液 浑浊,但无明显丝状

3) 生理特征:

最适 pH 7.0~7.5,pH 范围 3.5~10.5,最适温度 25~35 ℃,范围 5~42 ℃,好气,利用葡萄糖产酸,氧化酶阳性,反硝化作用阴性,精氨酸脱氢酶阴性,明胶不水解,淀粉不水解,聚- β -羟基丁酸盐不积累.可供生长的碳源:葡萄糖,蔗糖,阿拉伯糖,山梨糖,果糖,鼠李糖,乳糖,麦芽糖, β -丙氨酸,DL-精氨酸,Mesoanistol.来源:土壤.30 ℃ 琼脂培养基上该菌的电镜照片见图 4.

研究的结果表明,该菌是属于假单胞菌属(*genus Pseudomonas*).鉴定是以革兰氏染色,运动性,过氧化氢酶活性,氧化酶活性,明胶液化等性能为基础的,比较本假单胞菌和假单胞菌属部 1~10 个典型菌株的分类特性,可见,菌株 H-1 与 *Pseudomonas ciichri* 最为接近.要真正决定菌株 H-1 的属性,还需进行进一步的研究.菌株 H-1 暂命名为 *Pseudomonas sp.* H-1.

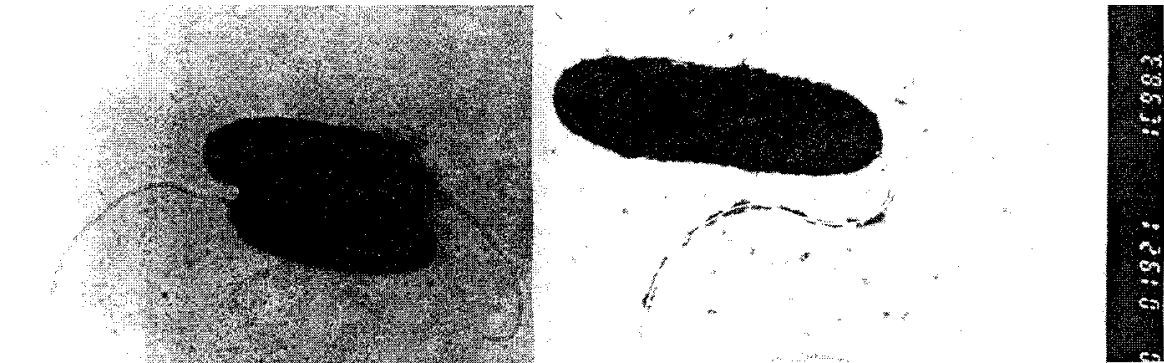


图 4 菌株 H-1 的电子显微镜照片
Fig.4 Electronic micrograph of strain H-1

2.3 诱变

菌株 H-1 进行紫外线照射,致死率 90%. 选得一株诱变菌株 A5,其脂肪酶生产能力达 27.3 U/mL 左右,UV 诱变正突变的结果见图 5.

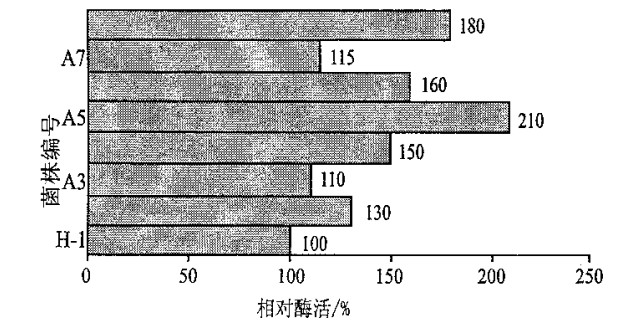


图 5 UV 诱变正突变结果
Fig.5 Results of positive UV mutation

菌株 A5 进一步用 NTG 处理两次,致死率 90%. 第一次处理,只有 4 株突变菌株是正突变,其结果见图 6. 突变株 B12 的产酶活力最高,达 35.5 U/mL.

再对突变株 B12 进行 NTG 处理,选得两株突变菌株 H58-1 和 H58,其产酶活力分别为 37.5 U/mL 和 40 U/mL.

菌株 H58 进行了性能稳定性试验. 结果是良好的. 传代 5 次仍能保持高的产酶活性. 其结果见表 2. 高修功等也报道了相同的研究结果,其野生菌株

2106 经 UV 和 NTG 处理后,产酶活力提高了 3.25 倍.

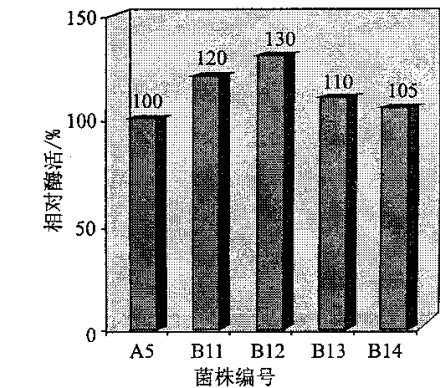


图 6 NTG 诱变正突变结果
Fig.6 Results of positive NTG mutation

表 2 *Pseudomonas* sp. H-58 的稳定性
Tab.2 *Pseudomonas* sp. H-58 stability

传代次数	脂肪酶酶活/(U/mL)
第一代	40.38
第二代	39.95
第三代	41.53
第四代	40.75
第五代	41.08

参考文献

[1] KAZUTOSHI U ,TAKUYA H ,KATSUTOSHI Y. Superinducers for induction of thermostable lipase production by *Pseudomonas* species NT-163 and other *Pseudomonas*-like bacteria[J]. *Biotechnology Techniques* , 1996 (10) 267~272

[2] LIN SHUEN-FUH ,CHIOU CHIEN-MING , TSAI YING-CHIEH. Effect of Triton x-100 on alkaline lipase production by *Pseudomonas Pseudoaicaligenes* F-111[J]. *Biotechnology Letters* ,1995 ,17 959~962

[3] HARY RAZAFINDRALAMBO ,CHRISOPHE BLEKER , GEORGES LOGNAY. Improvent of enzymatic synthesis yields of

- flavour acetates :The example of the isoamyl acetate[J]. **Biotechnology Letters** ,1994 ,16 :247~250
- [4] MANJON A , IBORRA L , AROCAS A . Short-chain flavor ester synthesis by immobilized Lipase in organic media[J]. **Biotechnology Letters** ,1991 ,13 :339~344
- [5] JAEGER K E , REETZ M T. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology[J]. **Trends in Biotechnology** ,1998 ,16(9) :396~403.
- [6] LIN SHUEN-FUH , CHIOU CHEN-MING , TSAI YING-CHIEH. Effect of Triton x-100 on alkaline lipase production by *Pseudomonas Pseudoaicallogen* F-111[J]. **Biotechnology Letters** ,1995 ,17 :959~962
- [7] SERGIO R , JOEL C , KIEBOOM A et al. Protease-catalyzed regioselective esterification of sugars and related compounds in anhydrous dimethylformamide[J]. **J Am Soc** ,1988 ,110 :584~589
- [8] XIAO Y W , SANGNA J , LI Yu-yen. An investigation of crude lipases for hydrolysis ,esterification ,and transesterification[J]. **Enzyme and Microbial Technology** ,1996 ,19 :226~231
- [9] DORDICK J S. Principle and Applications of Nonaqueous Enzymology in Applied Biocatalysis[M]. Blanch H W ed. New York : Marcel Dekker Inc ,1991.
- [10] CARREA G , RIVA S , SECUNNDO F. Enzymatic synthesis of various 1'-o-sucrose and 1-o-fructose ester[J]. **J Chem Soc** ,1989 ,934~935
- [11] YAMADA K , OTA Y , MACHIDA H. Production of Lipase by microorganisms I The selection and the identification of a new strain. II. Determination of lipase[J]. **Nippon Nogeikagaku Kaishi** ,1962 ,36 :860
- [12] KOMAGATA K. Differentiation of genus *Pseudomonas* and related Aerobic Bacteria[J]. **J Gen Appl Microbiol** ,1961 ,7 :282~284
- [13] SHATAI Y , DAYA M N. Production ,purification ,and properties of a lipase from a Bacterium(*Pseudomonas aeruginosa* YS-7)capable of growing in water-restricted environments[J]. **Appl Environ Microbiol** ,1992 ,58 :174~180
- [14] YEOH H H , WONG F M , LIM G. Screening for fungal lipases using chromogenic lipid substrate[J]. **Mycologia** ,1986 ,78 :298~300
- [15] MOHAMMED M E. Production of lipases by certain thermotolerant bacteria[J]. **Egypt J Microbiol** ,1986 ,21(1) :81~92

(责任编辑 朱明)