

高碱基转移活性磷脂酶 D 生产菌种的筛选及酶性质研究

王兴国 裴爱泳 陶文沂 沈蓓英

(食品学院)

摘要 从油厂土壤中筛选得到一株产较高磷脂碱基转移活力磷脂酶 D 的菌种,经初步鉴定为假单胞菌属,通过对发酵条件的优化,确定了最优发酵培养基和酶的最适 pH 值。

主题词 磷脂酶 D; 菌种; 筛选; 碱基转移; 假单胞菌属

中图分类号 TQ646

0 引言

磷脂酶 D(E. C3. 1. 4. 4)从 1947 年由 Hanahan 等^[1]在胡萝卜中首次发现以来,已分别从洋白菜(cabbage leaf)^[2]、菠菜(spinaik)^[3]、甜菜(suger beets)^[4]、棉籽(cotton seeds)^[5]、芽甘蓝(brussels sprout)^[6]、花生(peanut seeds)^[7]、蚕豆(fave bean)^[8]、绿豆(mang bean)^[9]及大豆(soy bean)^[10]中发现。微生物磷脂酶 D 是本世纪 60 年代发现的,至今已开发出多种产磷脂酶 D 的菌种,常见的有棒状菌属(*Corynebacterium*)^[11]、链霉菌属(*Streptomyces*)^[12]、大肠杆菌属(*Escherichia*)^[13]、沙门氏杆菌属(*Salmonella*)^[14]及假单胞菌属(*Pseudomonas*)^[15]等。但是迄今为止发现的磷脂酶 D 大多具有较高的水解能力,只有少数具有较高的碱基转移能力。作者对具有碱基转移活性的磷脂酶 D 产生菌进行了筛选,从油厂油脚池旁筛选出一株较高碱基转移的菌株,根据该菌菌落形态,初步鉴定为假单胞菌属。利用正交试验法对培养基配方进行了优化,确定了最佳培养条件,并对磷脂酶 D 的基本性质进行了试验。

1 材料与方法

1.1 菌种

从油厂采集到 12 个土样,分离获得若干产酶菌株,其中以油脚池边采集的土样中分离获得的一株菌产酶最高,作为试验用菌。

1.2 培养基及培养条件

1.2.1 富集培养基(%) 大豆磷脂 0.5, KNO₃ 0.5, K₂HPO₄ 0.025, FeSO₄ · 7H₂O 0.0005,

收稿日期: 1995 11 07

NaCl 0.025, pH 7.0~7.4, 灭菌 1 atm, 15 min.

1.2.2 分离培养基(%) 大豆磷脂 0.5, KNO_3 0.5, K_2HPO_4 0.025, 琼脂 2. pH 7.2~7.4, 灭菌 1 atm, 15 min.

1.2.3 发酵培养基(%) 葡萄糖 0.5, 玉米浆 1, 蛋白胨 0.5, 酵母膏 0.5, K_2HPO_4 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05. 灭菌 1 atm, 15 min, 摇床频率 100 次/min(往复式), 140 次/min(旋转式), 发酵温度 26℃, 周期 2d.

1.3 仪器

1.3.1 薄层扫描紫外分光光度计(TLC/UV) 用于初筛时酶活性测定。

1.3.2 薄层氢火焰色谱 TLC/FID 仪 用于复筛时酶活性测定。测定条件见[16]。

1.4 方法

1.4.1 富集方法 以土样 1g(四分法取样)加入 9ml 生理盐水中, 振荡片刻后获得细胞悬浊液, 以此悬浊液一环接入富集培养基试管, 30℃左右恒温培养 3d. 富集后涂平板作分离培养。分离后的菌株作筛选用。

1.4.2 筛选方法 取平板上长出的菌株一环, 接种装有 25ml 发酵培养基的 250ml 三角瓶中, 于 26℃振荡培养 48h, 用薄板层析定性鉴别发酵液中的磷脂酶 D, 以产磷脂酶的菌种留作复筛用。对初筛获得的磷脂酶产生菌株, 再进一步用摇瓶复筛, 250ml 三角瓶装发酵培养基 30ml, 于旋转式摇瓶机上 26℃培养 48h, 发酵液离心后的上清液采用定量方法测定酶活, 选取产酶最高的菌株作为产酶菌株。

1.4.3 磷脂酶 D 测定方法

1) 定性方法 酶活力测定用底物系统包括 1mg 的卵磷脂、0.2ml 0.4mol/L 的醋酸缓冲液(pH 5.6)、0.2ml 0.2mol/L 的 CaCl_2 、0.08ml 50% 的甘油、0.5ml 乙醚及 0.32ml 的蒸馏水, 加入 0.5ml 的乙醚及加入 0.2ml 发酵液离心后的上清液。摇匀后于 25℃水浴保温 30min 后, 用沸水中止酶作用, 然后加入 2ml 乙醚萃取, 用试管振荡器振荡 1min 后待其分层, 取乙醚层(上层)作样品在薄板上点样, 并在展开剂中展开, 展开剂为: 三氯甲烷: 甲烷: 水 = 65: 30: 5, 最后用碘显色, 由显色情况确定是否产磷脂酶 D。

2) 定量方法 初筛时用 TLC/UV 测定磷脂相对含量, 复筛时用 TLC/FID 测定磷脂相对含量。

1.4.4 酶性质的测定方法

1) pH 影响的试验方法 最适 pH 试验时以各种不同缓冲液代替原酶活测定方法中的醋酸缓冲液, 按酶活测定方法进行, 求出各种不同缓冲液中 30min 磷脂酶的转化能力进行比较。

pH 稳定性实验时以 0.1ml 酶液与不同缓冲液 0.1ml 混合后, 30℃保温 18h, 然后以 0.9ml pH 7.5 磷酸缓冲液(0.025mol/L)稀释后按常法测定酶活, 计算残留酶活的百分率。

2) 温度影响的试验方法 最适温度试验按正常酶活测定方法进行, 控制水浴在规定的试验温度, 反应时间 30min, 按转化成磷脂酰甘油的百分数比较。

热稳定性试验时以发酵液于不同的规定试验温度水浴中保温处理 30min, 按常法测定酶活。

2 结果与讨论

2.1 磷脂酶 D 产生菌的分离

以大豆磷脂为唯一碳源的培养基对土壤微生物进行定向富集,使土壤中少数的目标菌得到优势繁殖,用此培养液制成浓度梯度的细胞悬液,分别涂布在分离培养基平板,在乳白色的不透明平板上出现少数透明圈围绕的菌落时,表明培养基中的大豆磷脂被所围绕的菌分解利用掉了,这种分解与磷脂酶的存在有一定的关系,透明圈的大小与产酶能力有关,本实验挑选有较明显的透明圈的菌株供粗筛用。

对分离培养基获得的有透明圈的 56 个菌株进行发酵培养,比较发酵后的产酶能力,根据酶活性的定性测定方法,以及在薄板上的磷脂酰甘油部位有明显的黄色出现的深浅判断其产酶能力,筛出 12 株作为试验菌株。作第一步粗筛,每株 1 瓶,用定量方法测定。选择 28 号作为下一步试验用菌,并对其进行培养条件的优化。

2.2 28 号菌株的某些特征及初步鉴定^[17]

在 CM 平板上,菌落呈圆形稍凸起,边缘整齐,菌落呈淡黄色,革兰氏染色阴性,染色后油镜观察为直的或微弯的杆菌,有长有短,有的近球状,其大小为 $10.5 \sim 11 \times (2 \sim 3) \mu\text{m}$ 。在斜面培养基培养 3d 有明显的黄色素产生,这是假单胞菌属中荧光群的特性,因此初步确定其为假单胞菌属。图 1 是 28 号菌的生长曲线。

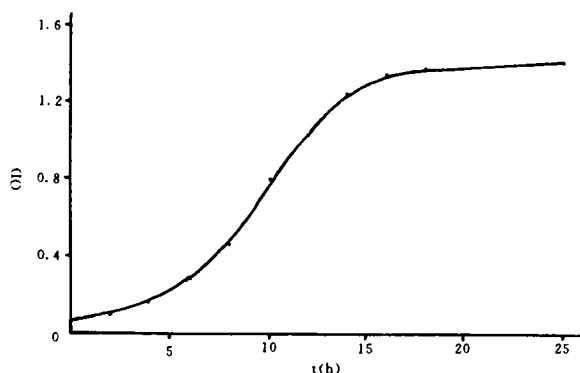


图 1 28 号菌的生长曲线

2.3 28 号菌株的发酵培养条件优化

采用正交试验的方法对 28 号菌的发酵培养基进行优化,包括金属离子、氮源、碳源及碳氢比的选择等。

正交试验将葡萄糖、酵母膏、蛋白胨合为一个因素,考虑四个因素的三水平;选取 $L_9(3^4)$ 正交表(表 1),不考虑交互作用,通过极差分析得到:

1) 最佳培养条件为(%) 蛋白胨 0.5,玉米浆 1.5,酵母膏 0.5,葡萄糖 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, K_2HPO_4 0.3。

2) 根据该酶催化形成的磷脂酰甘油量可以算出在最优发酵条件下其发酵上清液的酶活力为 4.35u/ml,碱基转移率 85.6%。

表 1 正交试验的因子水平

因 子	1	2	3
葡萄糖+蛋白胨+酵母膏	0.5+0.5+0.5	1+1+1	1.5+1.5+1.5
玉米浆	1.0	1.5	2
K_2HPO_4	0.1	0.2	0.3
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.02	0.05	0.1

2.4 磷脂酶 D 的性质

2.4.1 pH 对酶作用的影响 28 号菌所产生的磷脂酶 D 其最适 pH 范围见图 2。由图可知,磷脂酶 D 的适宜 pH 范围为 8.0~8.5。

2.4.2 温度对酶作用的影响 由图 3 可知,该磷脂酶 D 最适作用温度范围为 25~30℃。

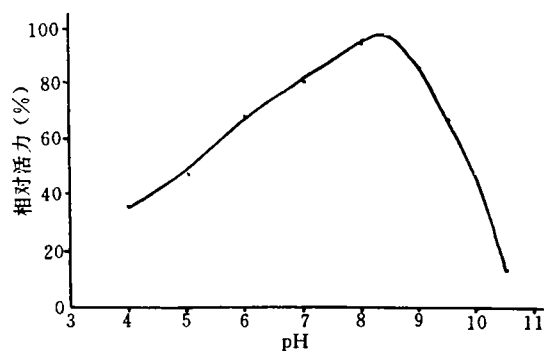


图2 pH对磷脂酶D作用的影响

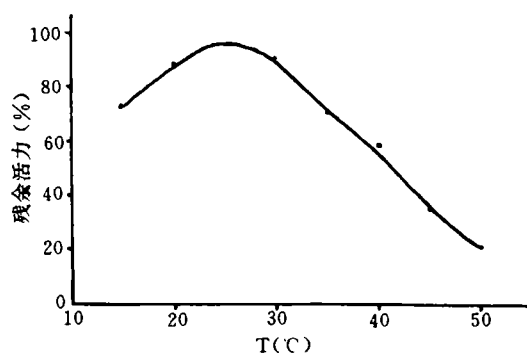


图3 温度对磷脂酶D作用的影响

2.4.3 酶的热稳定性 图4显示了温度与残余酶活的关系。温度稳定范围低于40℃。

2.4.4 酶的酸碱稳定性 图5显示相对残留酶活与pH的关系,由图可知:磷脂酶D在pH6.0~9.5稳定,在pH10.0以上或pH6.0以下失活严重。

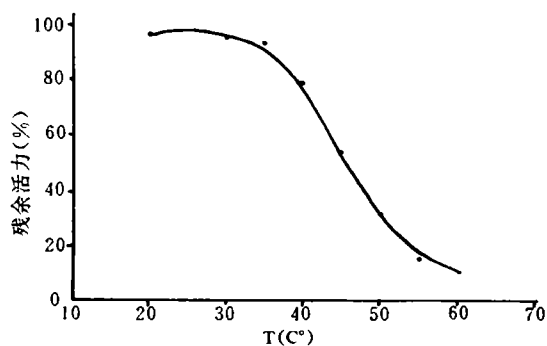


图4 磷脂酶D的热稳定性

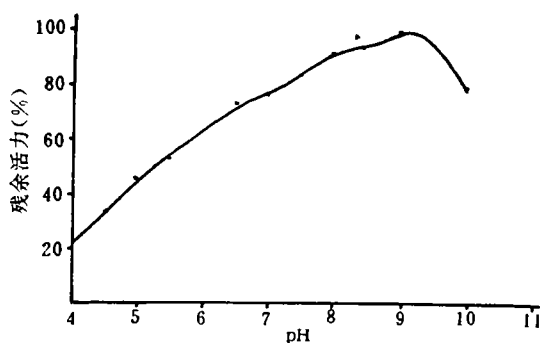


图5 磷脂酶D的酸碱稳定性

3 结 论

从油厂土壤中筛选得到一株产较高磷脂碱基交换作用的磷脂酶D菌种,经初步鉴定为假单胞菌属,通过对发酵条件的二次优化,确定了最优发酵培养基为(%):

蛋白胨 0.5,玉米浆 1.5,酵母膏 0.5,葡萄糖 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, K_2HPO_4 0.3.此时该菌株的产酶活力为4.35u/ml,碱基转移率85.6%。

通过对磷脂酶D基本性质摸索得到该酶的最适pH范围为8.0~8.5,最适温度为25~30℃,pH稳定范围为6.0~9.5,热稳定性范围为低于40℃。

参 考 文 献

- 1 Hanahan D T, Chaikoff I L, J. Biol. Chem. 1947,169:699
- 2 Yang S F. Methods in Enzmology—Lipids 1969,38:208
- 3 Katrs M. Can. J. Biochem. Physiol. 1954,32:571
- 4 Kates M. Nature 1953,172:814
- 5 Tookey H L, et al. Plant Phospholipase D, J. Biol. Chem. 1956,218:213
- 6 Davidson F M,et al. Biochem. J. 1958,69:458
- 7 Heller M,Arad R. Biochem. Biophys. Acta 1970,210:276~286
- 8 Tzur R,ShapiroB. idib 1972,280:290~296
- 9 Herman E M,et al. Plant Physiol. 1980,66:1001
- 10 Kates M. et al. Can. J. Biochem. Phsyiol. 1954,33:575
- 11 Fossum K,et al. Acta Pathol. mol/Licrobiol. scand. 1963,57:295
- 12 Imamura S,et al. J. Biochem. 1979,85:79
- 13 Ono Y, et al. J. Bacteriol. 1970,103:111
- 14 Coleman K, et al. J. Bacteriol. 1983,153:909
- 15 Cole R, et al. Can. J. Biochem. 1977,55:1228 1977
- 16 Coleman.K. etal Biochem. Biophys. Acta. 1970,219:81
- 17 王兴国等. 无锡轻工大学学报,1995,14(1)
- 18 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法. 科学出版社,1978

Selection of Bacteria Producing Phospholipase D with Higher Base Transformation Activity and Study of Enzymatic Property

Wang Xingguo Qui Aiyong Tao Wenyi Sheng Peiying
(Shool of Food Science & Technology)

Abstract A *Pseudomonas* strain producing phospholipase D with higher base transformation activity was isolated from soil in oil plant. The fermentation conditions and the enzymatic properties were further optimized.

Subject-words Phospholipase D: Strain: Selection: Base transformation activity: *Pseudomonas*