

假单胞菌 JW 12 发酵液的脂肪酶稳定性

陈守文 徐 柔 章克昌

(无锡轻工大学生物工程学院, 无锡, 214036)

摘要 通过对假单胞菌 (*Pseudomonas sp.*) JW 12 发酵液脂肪酶稳定性的研究, 表明了发酵液脂肪的稳定性主要受蛋白酶的影响。当用吐温 80 作为碳源时, 通过对发酵培养基组成的调整, 达到降低蛋白酶的目的, 提高发酵液脂肪酶酶活。

关键词 假单胞菌; 脂肪酶; 蛋白酶; 稳定性

分类号 TQ925.6

0 前 言

脂肪酶(三酰甘油酰基水解酶 EC3.1.13)是工业酶制剂中最重要的酶类之一, 得到广泛的研究和应用。脂肪酶生产的不稳定性影响了脂肪酶的生产和应用。Fukumoto J 等^[1]发现脂肪酶的不稳定性主要由于蛋白酶的污染而导致的, 此外还发现脂肪酶在纯化和贮藏中, 铁离子的质量分数大于 0.5×10^{-6} 就能快速钝化脂肪酶, 并提出降低发酵液中碳氮比以及 Fe^{2+} 的浓度等措施, 较满意地克服了 *Rhizopus delemar* 脂肪酶的稳定性。Jane G E 等^[2]发现 *P. aeruginosa* 脂肪酶和酯酶酶活到达高峰后迅速下降, 认为吸附作用或蛋白酶水解可能是酶活急剧下降的原因, 然而没有在发酵上清液中检测出蛋白酶的酶活。Ishihara K 等^[3]发现在培养过程中过量的铁离子可能使脂肪酶失活。我国科研工作者^[4]也发现, 假丝酵母 AS 2.1203 在脂肪酶活达到最高峰后会下降, 继续发酵会使酶活力损失。我们在产酶时间进程曲线和酶活分析过程中, 发现细菌脂肪酶具有不稳定性特点。

根据假单胞菌 JW 12 脂肪酶的酶学基本性质, 可初步判断发酵液中该酶的不稳定现象并非为热不稳定、pH 不稳定以及金属离子等引起的, 主要原因之一可能为蛋白酶水解。故重点分析蛋白酶和脂肪酶的关系以及通过调整发酵液的培养基组成, 达到降低蛋白酶活力和稳定脂肪酶的目的。

1 材料和方法

1.1 菌种

国家“九五”科技攻关项目

收稿日期: 1998-03-10

第一作者: 陈守文, 男, 1968 年 3 月生, 工学博士

©1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

假单胞菌 JW 12,无锡轻工大学再生资源实验室筛选保藏菌体.

1.2 发酵培养基 (%)

橄榄油 2,豆饼粉 2,玉米浆 2,硝酸钠 0.5,磷酸氢二钾 0.5, pH8.0~8.5,培养基灭菌温度为 0.1 MPa,20 min.

1.3 培养方法

挑取一环斜面种子,发酵培养基中,30℃,150 r/min培养,定时取发酵液离心(8 000 r/min,10 min),上清液供测试分析.

1.4 脂肪酶活力测定(pNPL法^[5])

取 0.5 mL pNPL溶液(80 mg对硝基苯月桂酸酯,5 mL异丙醇,1 mL曲拉通 X-100溶于 5 mmol/L的 pH5.0 NaAc-HAc缓冲液并定容至 100 mL与 0.5 mL pH8.5 0.05mol/L的 Tris缓冲液混合,加入 0.1 mL稀释的发酵上清液,在 45℃下反应 10 min,用 1.5 mL乙醇中止反应.在测定波长 410 nm下,测定其吸光值,然后求得酶活.

1.5 碱性蛋白酶酶活测定

按福林法^[4]测定

2 结果与分析

2.1 蛋白酶和脂肪酶的关系

通过测定 JW 12发酵过程曲线(见图 1),了解蛋白酶和脂肪酶的关系,并将酶液放入 5℃冰箱冷藏 24 h处理,测定脂肪酶的损失率.结果见表 1.

表 1 假单胞菌 JW 12发酵液的脂肪酶稳定性情况

酶活 / (μmol/(min·mL))		4℃放置 24 h后脂肪酶损失率 %		发酵时间从 64 h 延长至 87.5 h 的脂肪酶损失率 %
发酵 64 h	发酵 87.5 h	发酵 64 h	发酵 87.5 h	
0.67	14.9	0.39	7.3	41.8

从表 1中可看出假单胞菌 JW 12菌株发酵液静置冷藏可导致不同程度的脂肪酶失活,但由发酵时间延长引起的酶失活更强烈.由图 1发现菌体分泌脂肪酶和蛋白酶有一定的关系.在菌体生长初期,菌体分泌较高浓度的蛋白酶,供分解蛋白质的需要;32 h时,菌体产生脂肪酶出现第 1个峰道,此时蛋白酶酶活反而在低谷;此后蛋白酶酶活上升,脂肪酶酶活呈下降趋势;64 h时,脂肪酶和蛋白酶都出现第 2个峰值(特别是中性蛋白酶酶活急剧升高),随后脂肪酶和蛋白酶酶活下降.依据脂肪酶和蛋白酶的消化

长曲线,反应了脂肪酶和蛋白酶酶活变化规律,并说明了蛋白酶可导致脂肪酶的失活

Roussis I G.等发现,添加从 *P. fluorescens* GR83菌株中纯化的蛋白酶到培养上清液中,使脂肪酶活力降低 16%^[6].由于我们没有分离假单胞菌 JW 12的蛋白酶.现选用枯草杆

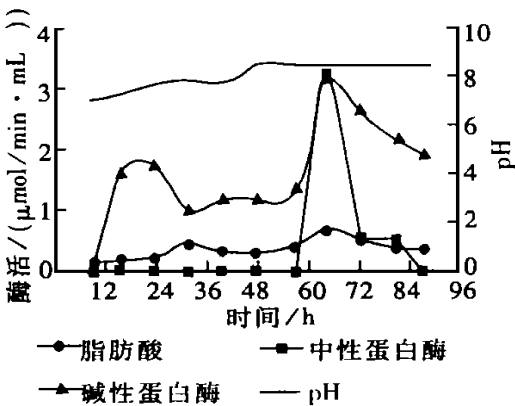


图 1 假单胞菌 JW 12菌株发酵曲线

菌 SA1. 398中性蛋白酶酶制剂 ,观察其对发酵液脂肪酶的分解现象 ,见表 2 结果表明外加中性蛋白酶 [终浓度 $20\mu\text{mol}/(\text{min}^\circ\text{ mL})$] 降低了发酵液的脂肪酶酶活

表 2 中性蛋白酶对脂肪酶的分解

	温度 / $^\circ\text{C}$	处理时间 /h	酶活 / ($\mu\text{mol}/(\text{min}^\circ\text{ mL})$)	酶活损失率 %
中性蛋白酶 (SA1. 398)	45	1	0. 24	46. 7
对照 (1)	45	1	0. 27	40
对照 (2)	4	1	0. 45	0

2. 2 降低蛋白酶活力的措施

有多种方法降低菌株产蛋白酶的能力。其中从遗传角度上考虑 ,可筛选产脂肪酶活力高而蛋白酶活力低的优良菌株 ;当菌株确定后 ,可通过诱变手段 ,筛选蛋白酶缺陷型菌株 ; Unilever的研究工作者定点改造 *Pseudomonas* 脂肪酶 ,提高对蛋白酶的抗性^[7]。从生理生化角上考虑 ,可通过代谢调控 ,或是添加蛋白酶抑制剂 ,降低蛋白酶的产量。鉴于假单胞菌 JW 12菌株胞外蛋白酶的活力较低 ,不宜考虑诱变手段 ;由于碱性蛋白酶都是丝氨酸酶 ,细菌脂肪酶也是丝氨酸酶 ,添加蛋白酶抑制剂也是不适宜的。因此笔者只考虑从代谢调控角度降低蛋白酶的活力。

豆粕是细菌产脂肪酶的优良有机氮源 ,大分子蛋白质诱导蛋白酶的产生 ,小分子的氨基酸则具有反馈阻遏蛋白酶生成的能力。豆粕水解液具有大量游离氨基酸 ,选用豆粕水解液代替豆粕 ,具有反馈阻遏蛋白酶生成的能力。我们考察豆饼粉和豆粕水解液等有机氮源对产酶的影响 ,结果见表 3。

表 3 发酵培养基组成对菌体酶活的影响 $\mu\text{mol}/(\text{min}^\circ\text{ mL})$

发酵培养基组成		终 pH	脂酶酶活	中性蛋白酶酶活	碱性蛋白酶酶活
碳 源	氮 源				
橄榄油	豆饼粉	9. 0	0. 40	0. 68	2. 68
橄榄油	豆饼水解液	8. 3	0. 08	0. 34	0. 54
吐温 80	豆饼粉	9. 0	3. 57	2. 14	4. 14
吐温 80	豆饼水解液	8. 5	3. 81	1. 62	3. 22

注: 碳源浓度为 2% ,豆饼水解液浓度 5% , 橄榄油为碳源的发酵培养时间为 64 h,吐温 80为碳源的发酵培养时间为 48 h.

由表 3,可得到如下结论: 1)作为脂肪酶的诱导物 ,吐温 80的诱导效果远较橄榄油的好。2)单独观察碳氮源对发酵液的碱性蛋白酶的影响可知 ,吐温 80作碳源时 ,其发酵液的碱性蛋白酶酶活较橄榄油作碳源的高 ,说明了吐温 80不仅充当碳源的角色 ,诱导脂肪酶产生 ,而且增强了细胞膜的通透性 ,提高蛋白酶的分泌量。3)单独观察氮源对发酵液的碱性蛋白酶的影响可知 ,在相同碳源的前提下 ,豆饼水解液是豆饼的氨基酸水解液 ,与豆饼作氮源相比 ,能降低碱性蛋白酶的产量 ;在以吐温 90为碳源时 ,能提高脂肪酶的产量。在橄榄油作碳源时 ,由于豆饼粉为不易分解的氮源 ,豆饼水解液为易利用的氮源 ,此时氮源对菌体产生脂肪酶的调节影响 ,比氮源对菌体产生蛋白酶的调节而导致脂肪酶失活的影响大 ,以致豆饼水解液作氮源的产脂肪酶效果反而较豆饼的效果差。

3 讨 论

假单胞菌 JW12发酵液中脂肪酶的稳定性和蛋白酶有较大的关系,发酵后期蛋白酶的存在,可严重导致脂肪酶失活,因而及时结束发酵过程可提高脂肪酶的稳定性。此外通过调节培养基碳源和氮源的组成,可达到降低发酵液蛋白酶的目的,从而提高发酵液脂肪酶的酶活。氮源也可调节脂肪酶的生产,在考虑选用不同氮源降低蛋白酶生产的同时,还需综合考虑其对脂肪酶生产的影响

参 考 文 献

- 1 Juichiro Fukumoto, Yoshio Tsujisaka, Mieko Iwai. Preparation of a stable lipase composition and its purification. United States Patent Office, 3 262 863, 1996
- 2 Gilbert Jane E, Drozd JW, Jones C W. Physiological regulation and optimization of lipase activity in *Pseudomonas* EF2. J Gen Microbiol, 1991, 137: 2215~ 2221
- 3 Kazuto Ishihara, Takahiro Suzuki, Tsunao Yamane, et al. Effective production of *Pseudomonas fluorescens* lipase by semi-batch culture with turbidity-dependent automatic feeding of both olive oil and iron ion. Appl Microbiol Biotechnol, 1989, 31: 45~ 48
- 4 张树政主编. 酶制剂工业(下册). 北京: 科学出版社, 1984
- 5 Winkler U K, Stuckmann M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. J Bacteriol, 1979, 138: 663~ 670
- 6 Roussis I G, Karabalis I, Papadopoulou C. Some Properties of Extracellular Lipase from a *Pseudomonas fluorescens* Strain. Lebensm-Wiss Technol., 1988, 21(4): 188~ 194
- 7 Paul Woolley, Steffen B Petersen. Lipases: their structure, biochemistry and application. Cambridge University Press, 1994

Study on Lipase Stability of *Pseudomonas* sp. JW12 Supernatant

Chen Shouwen Xu Rou Zhang Kechang

(School of Bioengineering, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract Stability of lipase produced by *Pseudomonas* sp. JW12 was investigated. It was found that the stability was mainly influenced by the presence of proteases. When Tween 80 was used as carbon source, the proteases activity declined and lipase activity improved by adjusting fermentation medium composition.

Key-words pseudomonas; lipase; protease; stability

(责任编辑: 陈 娇)