

文章编号: 1001-7453(1999)03-0007-05

用筛选抗性突变株法选育 碱性脂肪酶的高产菌

李江华¹, 邬敏辰², 陶文沂¹, 邬显章¹

(1. 无锡轻工大学, 江苏无锡 214036; 2. 复旦大学, 上海 200433)

摘要: 以圆弧青霉白色变株 PB227 为出发株, 通过多次诱变, 筛选抗真菌抗生素的抗性株和抗底物、底物结构类似物或分解产物的抗性株, 获得一株己酸抗性突变株 PG37, 其产酶水平比出发株 PB227 菌株提高了 1.5 倍, 达到 $557 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$. PG37 所产脂肪酶的最适作用 pH 为 10.0, 最适作用温度为 25[°], 在 pH 7.0~10.5 范围内稳定.

关键词: 碱性脂肪酶; 圆弧青霉; 诱变

中图分类号: TQ925.6 文献标识码: A

在普通洗涤剂中添加脂肪酶, 能提高洗涤剂的去污能力并降低表面活性剂和三聚磷酸钠的用量, 减少对环境的污染, 因此该酶的研制开发日益受到重视^[1,2]. 由于洗涤剂溶液的 pH 大都在 9.0 以上, 因此用于洗涤剂的脂肪酶也要求在 pH 9.0~11.0 的范围内具有较高的活力和稳定性. 有关碱性脂肪酶生产菌选育的文献大多只谈及土壤等的筛选, 菌种改良的方法和结果则很少见报导^[3~6]. 本文报道了以圆弧青霉白色变株 PB227 为出发株, 经过多次常规理化诱变, 再以克霉唑、制霉菌素、柠檬酸钠、琥珀酸钠、三丁酸甘油酯、丁酸和己酸为选择培养基快速筛选碱性脂肪酶高产菌的过程.

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌种 圆弧青霉白色变株(*Penicillium cyclopium* var *album*) PB227^[7].

1.1.2 培养基

1) 固体(分离)培养基(g/dL): 土豆 20.0, 蔗糖 2.0, 琼脂 2.0; 此培养基用于菌种保藏、斜面种子和平板分离.

2) 选择培养基: 固体培养基中分别加入适量的克霉唑、灰黄霉素、制霉菌素、柠檬酸钠、琥珀酸钠、三丁酸甘油酯、丁酸和己酸等.

3) 发酵基础培养基(g/dL): 豆饼粉 2.0, 玉米浆 5.0, K_2HPO_4 0.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1,

收稿日期: 1998-09-21; 修订日期: 1999-03-21

基金项目: 国家“八五”科技攻关项目(85-08-03-07)

作者简介: 李江华(1966年4月生), 男, 江西九江人, 工学硕士, 助理研究员.

豆油 0.4; pH 自然.

1.1.3 试剂 橄榄油 北京芳草医药研制公司提供; 聚乙烯醇(聚合度为 1750 ± 50) 北京红星化工厂提供; 其余均为国产分析纯或化学纯试剂

1.2 方法

1.2.1 诱变方法 DES+ NTG、UV、NTG、UV+ NTG 常规诱变^[8].

1.2.2 平板初筛方法 将诱变后的孢子悬浮液涂布于选择培养基平板上, 随机挑取在选择培养基上生长的菌落, 转接到土豆汁斜面上于 28 °C 培养 4 d, 作为摇瓶的复筛菌株.

1.2.3 摇瓶复筛方法 250 mL 的三角瓶中装发酵培养基 25 mL, 接种一环孢子, 于旋转式摇床振荡培养 2 d, 转速 250 r/min, 偏心距 4.5 cm, 发酵温度 28 °C.

1.2.4 碱性脂肪酶活力的测定 采用酸碱滴定法测定碱性脂肪酶的酶活. 反应液的组成为: 橄榄油-聚乙烯醇乳化液 5 mL, 0.05 mol/L pH 10.0 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 4 mL, 稀释的待测酶液 1 mL. 橄榄油-聚乙烯醇乳化液由 3% 聚乙烯醇溶液 3 份加橄榄油 1 份于组织捣碎机内乳化 6 min 而成. 取 50 mL 烧杯两只分别作为对照和样品, 分别加入上述反应液, 25 °C 反应 10 min 后, 加入 15 mL 95% 的乙醇溶液终止反应, 用 0.05 mol/L 的 NaOH 溶液滴定至 pH 10.3, 对照组的乙醇应在加酶液前加入. 在上述反应条件下, 每分钟催化橄榄油水解产生 1 μmol 脂肪酸的脂肪酶量定义为一个脂肪酶单位.

1.2.5 菌丝体内酶活的测定 按文献[9]中的方法进行.

2 结 果

2.1 菌种选育

2.1.1 抗真菌抗生素抗性株的选育 将紫外线照射后的 PB237 菌株的孢子悬液涂布于制霉菌素 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和克霉唑 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的选择培养基平板, 挑取在选择平板上生长的菌落进行摇瓶复筛, 几株产酶性能较好的突变株的情况见表 1, 其中 PC2 菌株最高.

表 1 PB227 菌株的抗真菌抗生素抗性株的诱变结果

菌株	相对酶活/ %	菌株	相对酶活/ %
PC 2	114	PC21	111
PC 11	109	PC22	106
PC 13	103	PC26	103
PC 17	103	PB227	100

2.1.2 抗底物结构类似物抗性株的选育 将亚硝基胍(2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理后的 PC2 菌株孢子悬液涂布于琥珀酸钠(2%) 的选择培养基, 挑取约 300 株进行摇瓶初筛, 选其中相对酶活较高的再进行摇瓶复筛. 筛选结果见表 2, 其中 PD32 菌株最高.

以亚硝基胍(2 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理 PD32 菌株孢子悬浮液 1 h, 再于紫外线下照射 3 min, 涂布于柠檬酸钠(2%) 选择培养基. 挑取约 180 株摇瓶初筛, 选结果较好的 9 株进行摇瓶复筛, 结果见表 3, 选择其中的 PE92 作为进一步试验用菌株.

表 2 PC2 菌株的琥珀酸钠耐性株的诱变结果

菌株	相对酶活/ %	菌株	相对酶活/ %
PD5	111	PD32	116
PD6	107	PD99	108
PD11	100	PD146	105
PD17	111	PD253	110
PD21	113	PD279	107
PD23	97	PC2	100

表 3 PD32 菌株的柠檬酸钠耐性株的诱变结果

菌株	相对酶活/ %	菌株	相对酶活/ %
PE 9	101	PE69	104
PE 16	100	PE71	102
PE 31	107	PE92	118
PE 53	98	PE134	107
PE 59	100	PD32	100

2.1.3 抗底物、分解产物抗性株的选育 在实验中作者发现某些底物和分解产物对菌种的生长和产酶均有一定的抑制,见表4.选育解除了这些底物或分解产物反馈阻遏的突变株,有可能提高酶的产量.

表4 底物或分解产物对 PE92 菌株生长和产酶的影响

添加物	浓度/%	生长状况*	发酵酶活/($\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$)
三丁酸甘油酯	0.25	+	147
	0.5	-	0
丁酸	0.25	+	464
	0.5	-	449
己酸	0.25	+	73
	0.5	-	29
对照	不添加	++	485

注: ++ 生长良好; + 生长较少; - 不生长

PE92 菌株经紫外诱变后,涂布于丁酸(0.5%)选择培养基上,从中随机挑取了54个菌落测定其产酶水平,结果见表5.

从表5可以看出,用丁酸选择培养基平板进行筛选,长出的菌落大部分为正突变株.其中一株 PE92-49,碱性脂肪酶活力为 $398 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$.

将亚硝基胍处理剂量为 $1000 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PE92-49 菌株孢子悬液涂布于三丁酸甘油酯(0.5%)选择培养基平板上,从长出的菌落中随机挑取144株测定其产酶水平,结果见表6.可以看出,在三丁酸甘油酯(0.5%)选择培养基上生长的菌落93.1%都是正突变.其中一株 PF144 菌株,碱性脂肪酶活力为 $469 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$,比出发株 PE92-49 提高了20.3%.

将 PF144 菌株的单孢子悬液在30 W 紫外灯下照射60 s,涂布于己酸(0.5%)的选择培养基平板上.从长出的菌落中随机挑取75株进行摇瓶复筛,结果见表7.其中一株 PG37 菌株,碱性脂肪酶的活力为 $557 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$,比出发菌株 PB227 提高了1.5倍.

表6 PE92-49 菌株的三丁酸甘油酯耐性株的诱变结果

碱性脂肪酶的相对活力*/%	菌株数	占测定总菌株的百分数/%
< 100	10	6.9
100~105	24	16.7
105~110	35	25.7
110~115	49	34.9
> 115	24	16.7

注:出发菌株 PE92-49 相对活力为100,碱性脂肪酶活力为 $390 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$

表5 PE92 菌株的丁酸耐性株的诱变结果

碱性脂肪酶的相对活力*/%	菌株数	占测定总菌株的百分数/%
< 100	5	9.3
100~105	18	33.3
105~110	20	37.0
> 110	11	20.4

注:出发菌株 PE92 相对活力为100,碱性脂肪酶活力为 $350 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$

表7 PE92 菌株的丁酸耐性株的诱变结果

碱性脂肪酶的相对活力*/%	菌株数	占测定总菌株的百分数/%
< 100	12	16.0
100~105	17	22.7
105~110	28	37.3
110~115	18	24.0

注:出发菌株 PF144 相对活力为100,碱性脂肪酶活力为 $479 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$

2.2 PG37 菌株的传代稳定性及胞内、胞外酶的确证

将 PG37 菌株在土豆培养基斜面上移接10代,同时测定其产酶性能,结果见图1.可以看出,PG37 菌株具有较好的传代稳定性.在不同的发酵时间分别测定不含菌体的发酵清液和菌丝体中的脂肪酶的活性,结果见图2.可以看出,PG37 菌株所产脂肪酶为胞外酶,便于酶的提取,非常有利于生产.

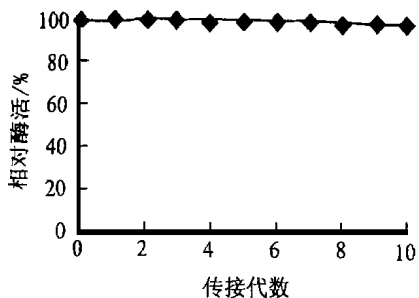


图1 PG37菌株在土豆培养基斜面上移接10代对酶产量的影响

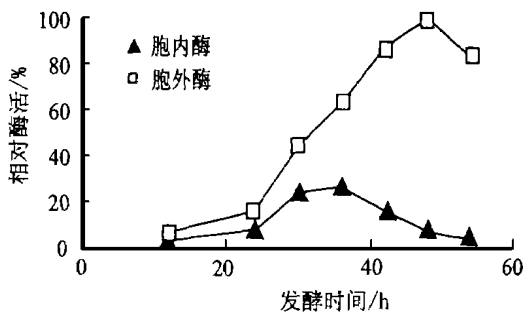


图2 PG37所产胞内胞外酶的比较

2.3 PG37菌株所产脂肪酶的酶学特性

在得到PG37菌株后,作者对其所产脂肪酶的酶学特性进行了初步探讨,结果见图3~6.结果表明,4041菌株所产脂肪酶为低温碱性脂肪酶,最适作用温度为25,最适作用pH为10.0.

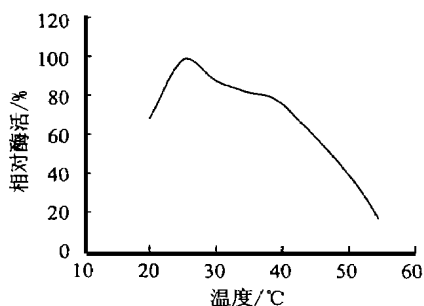


图3 反应温度对脂肪酶活性的影响

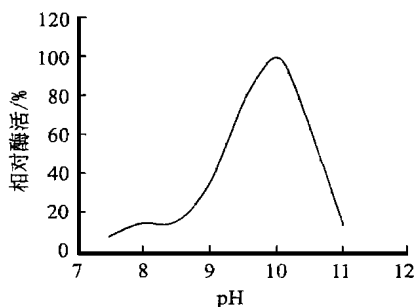


图4 反应pH值对脂肪酶活性的影响

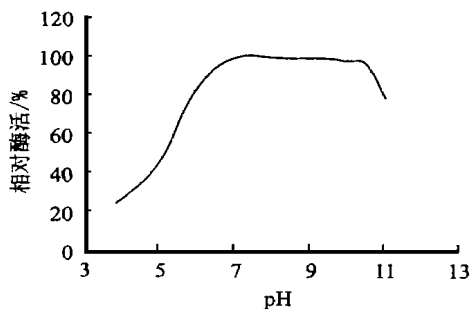


图5 脂肪酶的酸碱稳定性

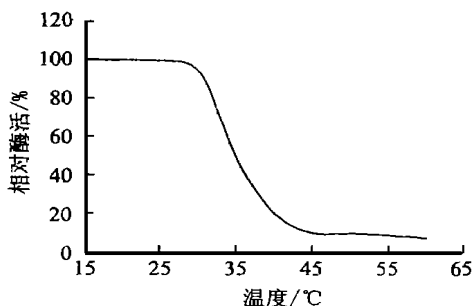


图6 脂肪酶的热稳定性

3 结论

研究表明,选育抗真菌抗生素抗性株和底物、底物结构类似物及分解产物的耐性株是提高脂肪酶产量简便有效的手段.经过多次诱变选育出一株具有较好的遗传稳定性的己酸抗性株PG37,其产酶性能比出发菌株PB227提高了1.5倍,达到 $557 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$.而且PG37所产碱性脂肪酶主要为胞外酶,其最适作用温度为25,最适作用pH为10.0,

属低温碱性脂肪酶, 适合我国居民的常温洗涤习惯. 在经过发酵条件优化后, PG37 的摇瓶和 3 m^3 发酵罐的发酵产酶水平可达到 $2\ 000\ \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ 左右(另文报道), 使其工业化生产成为可能.

参考文献:

- [1] LIN S. Production and stabilization of a solvent-tolerant alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111[J]. *Ferment Bioeng*, 1996, 82(5): 448 ~ 451
- [2] SAAD R. Production of lipase from *Aspergillus tamarii* and its compatibility with commercial detergents-culture medium and formation conditions optimization for enzyme production for use in surfactant composition[J]. *Folia Microbiol*, 1995, 40(3): 263 ~ 2663
- [3] WATANABE N, OTA Y, MINODA Y. Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms, cultural conditions and some properties of crude enzymes[J]. *Agric Biol Chem*, 1977, 41(8): 1353 ~ 1358
- [4] KOKUSHO Y, MACHIDA H, IWASAKI S. Studies on alkaline lipase: isolation and identification of lipase producing microorganisms[J]. *Agric Biol Chem*, 1982, 46(5): 1159 ~ 11645
- [5] 施巧琴. 碱性脂肪酶的研究-I. 菌株的分离和筛选[J]. *微生物学通报*, 1981, 8(3): 108 ~ 110
- [6] YEOH H, WONG F M, LIM G. Screening for fungal lipase using chromogenic lipid substrates[J]. *Mycologia*, 1986, 78(2): 298 ~ 300
- [7] 陶文沂. 微生物脂肪酶[D]. 无锡: 无锡轻工大学, 1988.
- [8] 微生物诱变育种编写组. 微生物诱变育种[M]. 北京: 科学出版社, 1973.
- [9] AISAKA K, TERADA O. Production lipoprotein lipase and lipase by *Rhizopus japonicus*[J]. *Agr Biol Chem*, 1979, 43(10): 2125 ~ 2129

Breeding of Alkaline Lipase Overproduction Strain by Screening Resistant Mutant

LI Jiang-hua¹, WU Min-chen², TAO Wen-yi¹, WU Xian-zhang¹

(1. School of Bioengineering, Wuxi University of Light Industry, Jiangsu Wuxi 214036; 2. Department of Biochemistry, Fudan University)

Abstract: After several mutagenesis, a mutant PG37 of resisting N-caproic acid was obtained from an alkaline lipase producing strain, *Penicillium cyclopium* var. album PB227, by screening mutant of resisting antifungal antibody, substrate, substrate analogue or hydrolyzate. The alkaline lipase yield of PG37 was increased by 1.5-fold as compared with strain PB227, and reached to $557\ \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$. The lipase produced by PG37 was most active at pH 10.0, 25 and was stable within the range of pH 7.0 ~ 10.5.

Key words: alkaline lipase; *penicillium cyclopium*; mutagenesis