

诱变选育脂肪酶高产菌株及其酶学性质

邓欣¹, 方真^{1*}, 张帆^{1,2}, 龙运多¹, 曾虹燕²¹中国科学院西双版纳热带植物园昆明分部生物能源组, 昆明 650223; ²湘潭大学化工学院, 湘潭 411105

摘要:面包干酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)为出发菌株,对其进行紫外和微波复合诱变,得高产突变菌株DX213,高产突变菌株酶活力为635 U/mL,为出发菌株的1.69倍。菌株富集培养5代,遗传性状稳定。DX213菌株的最优产脂肪酶条件为:培养温度30℃和培养液pH 7.5。酶学性质研究表明:脂肪酶的最适温度40℃、最适pH为7.5、脂肪酶在40℃以下稳定。 Fe^{3+} 离子对脂肪酶有激活效应,当 Fe^{3+} 离子浓度为0.03 g/mL时,脂肪酶活力高达720 U/mL。

关键词:微波; 菌株; 活性; 面包干酵母; 诱变

中图分类号:TQ645.1; Q814.9

文献标识码:A

Mutation Breeding of High-yield Lipase Strain and Properties of Lipase

DENG Xin¹, FANG Zhen^{1*}, ZHANG Fan^{1,2}, LONG Yun-duo¹, ZENG Hong-yan²¹Biomass group, Xishuangbanna tropical botanical garden, Chinese academy of sciences, Kunming 650223, China;²School of chemical engineering, Xiangtan University, Xiangtan 411105, China

Abstract: The mutation strain DX213 was obtained by UV and microwave treatment from *Saccharomyces cerevisiae*. Its enzymatic activity was 635 U/mL, enhanced by 69%. The genetic characters were stable after enrichment culture for five generations. The optimal conditions for producing lipase were culture temperature of 30℃ and pH of 7.5. Enzymatic properties were studied and found that the optimal temperature and pH for the lipase were 40℃ and 7.5 respectively. The enzymatic activity kept stable below 40℃. Fe^{3+} had an activating effect on lipase. The enzymatic activity went up to 720 U/mL when the Fe^{3+} concentration was 0.03 g/mL.

Key words: microwave; strain; activity; *Saccharomyces cerevisiae*; mutation

生物柴油作为石化燃料油的重要替代品,具有可再生、易降解、含硫量低和有害物质排放量小等优点,属环境友好型燃料。以植物油、动物油和废食用油等为原料与低碳醇(甲醇、乙醇、正丁醇等)进行酯交换反应,产物即为生物柴油(脂肪酸甲酯),副产物为甘油^[1-6]。发展生物柴油,原料是关键。一般来说,植物油的价格占生物柴油生产成本的70%~80%。中国人口众多,采用菜子油、大豆油、向日葵油等可食用油为原料制备生物柴油是不可行的,小桐子油不可食用但它与菜子油等可食用油有相似的化学组成,以小桐子油为原料制备生物柴油的应用和推广正是现阶段解决中国能源替代问题的最佳手段^[7-11]。中国科学院西双版纳热带植物园采用转基因技术对小桐子进行遗传改良研究,获得高产、高油

和抗逆的转基因小桐子优良品种-皱叶黑高桐,并在云贵地区大规模种植,为生物柴油的产业化提供原料。中国科学院西双版纳热带植物园生物能源组在自身大量实验的基础上,提出超声波协同固定化脂肪酶催化酯交换反应制备生物柴油新工艺(CN101230320A)^[12],该工艺具有能耗低、条件温和、生物柴油收率高等优点。本文报道以面包干酵母为出发菌株,经紫外和微波复合诱变,得高产脂肪酸突变菌株DX213及其酶学性质,突变菌株DX213价格低廉,催化效果好,可重复使用,遗传稳定性好,已在中国典型培养物保藏中心保藏,保藏编号CCTCCM 207082。

1 实验部分

1.1 菌株与培养基

面包干酵母(*Saccharomyces cerevisiae*):澳大利亚宾那斯集团(Bunslphilp&Company Limited),所用试剂均为分析纯。

收稿日期:2010-01-05

接受日期:2010-04-20

基金项目:国家高技术研究发展计划资助项目(2003AA214061),中国科学院知识创新工程重要方向性项目(KSCX2-YW-G-075)

* 通讯作者 Tel: 86-871-5190637; E-mail: zhenfang@xtbg.ac.cn

斜面培养基(g/L): 土豆 200.0、蔗糖 20.0、琼脂 20.0、pH 自然。

复筛培养液(g/L): 橄榄油 5.0 mL, 蛋白胨 4.0、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.0、 K_2HPO_4 2.0、 $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0。

平板分离培养基(g/L): 蛋白胨 10.0、橄榄油 10.0 mL、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5、NaCl 1.5、 K_2HPO_4 0.3、 $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15、琼脂 20.0 pH 7.5。121 °C 灭菌 20 min 后冷却到 60 °C, 加入无菌维多利亚蓝(4 mg/100 mL) 倒平板。

1.2 产脂肪酶菌株的生长培养及粗酶液制备

称取 2 g 面包干酵母细胞置于 100 mL 无菌水的三角瓶中, 28 °C 培养 2~3 d。接种一环菌悬液于斜面培养基上, 30 °C 培养 2~3 d。从斜面培养基上洗脱脂肪酶, 置装有玻璃珠三角瓶中, 振荡 25~30 min, 使脂肪酶充分分散, 离心分离, 取上层清液, 用磷酸盐缓冲液调至 pH 7, 得脂肪酶酶液。

1.3 诱变选育

紫外线诱变: 量取酵母菌悬液 5 mL, 加入无菌培养皿中, 以 30 W 的紫外照射仪于 30 cm 处照射, 设定不同的照射时间为不同的 UV 处理剂量。紫外线照射后, 暗修复 2 h。将诱变处理后的脂肪酶悬液作梯度稀释, 各样品进行活菌计数, 并与对照组比较, 计算致死率。将目的菌液涂布于平板分离培养基上, 30 °C 培养 2~3 d。

微波诱变: 以脉冲频率为 2450 MHz 的 650 W 家用微波炉, 分别对相同浓度和体积的酵母菌悬液进行辐射处理。每次辐射 5 s 后使培养皿冷却, 再进行辐射, 并将照射时间累计。设定不同的辐射时间为不同的微波处理剂量, 计算致死率。将目的菌液涂布于平板分离培养基上, 30 °C 培养 2~3 d。

筛选方法: 在平板分离培养基, 挑取单个诱变后显色圈直径大、色深的菌落进行摇瓶富集初筛、复筛。

1.4 出发菌株生长曲线

称取 2 g 面包干酵母细胞置于 100 mL 无菌水的三角瓶中, 30 °C 富集培养, 定时取样抽滤, 测滤出液脂肪酶酶活, 菌体用去离子水洗涤, 冷冻干燥至恒重, 得到该菌种的生长曲线。

1.5 酶活力测定

采用经典的橄榄油乳化法测定游离脂肪酶的酶活力, 在温度 30 °C、pH 7.5 条件下每分钟催化产生

1 μmol 油酸的酶量定义为一个酶活单位(U)。

2 结果与讨论

2.1 诱变育种

2.1.1 出发菌株生长曲线

出发菌株在富集培养液中生产脂肪酶进程见图 1。从图 1 可知, 出发菌株在较短(12 h) 停滞期后, 很快进入对数期(12~48 h), 后进入稳定期, 生产脂肪酶稳定期为 48~72 h, 然后进入衰亡期。出发菌株生产脂肪酶出现高峰与酵母生物量进入增长高峰的时间一致, 在 48 h 达酶活力高峰, 为 375 U/mL。富集培养超过 72 h, 酶活力逐渐降低。主要是因为菌体进入衰亡期, 菌体新陈代谢衰退, 酶活性降低之故^[13,14]。

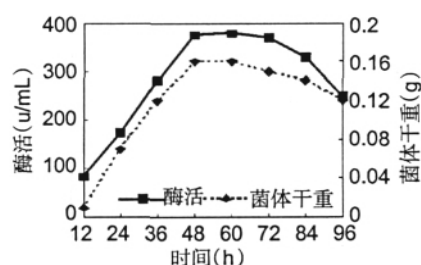


图 1 脂肪酶的生长曲线

Fig. 1 The growth curve of lipase strain

2.1.2 脂肪酶产生菌株诱变选育

为考察最适诱变条件, 采用不同的 UV 和微波诱变剂量对面包酵母进行复合诱变, 所得致死率结果见表 1 和表 2。结果表明, UV 照射 20 s 以及微波辐射 30 s, 面包酵母的致死率达到 99% 以上。

紫外线诱变: 将致死率超过 99.0% 的照射样品, 经平板分离培养初筛, 挑选 HC 值(水解透明圈与菌落直径之比) 相对较大, 显色圈较深的 5 株复筛, 结果发现正突变株 1 株, 此正突变菌株 DX212 酶活为 465 U/mL, 较出发菌株提高了 24%, 选择 DX212 作为出发菌株进行微波诱变。

微波诱变: 以同样筛选方式对微波诱变进行初筛、复筛。获得一株正突变株 DX213, 其酶活力达 635 U/mL, 较 DX212 提高了 36.6%, 为出发菌株的 1.69 倍。

将 5 mL DX213 菌株于富集培养液中, 每 48 h 转接一代至 5 代, 每代接种培养测定酶活, 结果为 (U/mL): 625、610、635、645 和 620, 可初步认为该菌株具有较好的遗传稳定性。

表 1 致死率与紫外照射时间
Table 1 Effect of UV irradiation time on lethal rate

时间 Time (s)	0	5	10	15	20	25	30	35	40
致死率 Lethal rate (%)	0	50.6	82.7	96.4	99.3	99.6	99.8	99.9	99.9

表 2 致死率与微波照射时间
Table 2 Effect of microwave irradiation time on lethal rate

时间 Time (s)	0	5	10	15	20	25	30	35	40
致死率 Lethal rate (%)	0	45.3	63.7	87.6	95.9	98.8	99.2	99.7	99.9

2.2 诱变育种

温度和 pH 是微生物生存的重要外部环境 ,也是影响微生物发酵的重要因素 ,接入 5 mL DX213 菌株于富集培养液中 ,120 rpm 振荡培养 ,对 DX213 菌株产酶培养温度和培养液初始 pH 值进行优化。

2.2.1 培养温度对菌株产酶的影响

温度是影响酶活性的重要因素之一 ,温度对酶促反应的影响有两个方面:一方面是当温度升高时酶促反应速度加快;另一方面由于酶本身是蛋白质 ,随着温度升高逐步变性失活 ,从而降低酶的反应速度。酶的最适反应温度是这两种过程平衡。在 pH 7.5 下振荡培养 48 h ,选取 5 ℃ 为梯度考察培养温度对产酶的影响 ,结果见图 2。温度在 20 ~ 30 ℃ 时 ,脂肪酶酶活力显著增加 ,培养温度 30 ℃ 时 ,培养液脂肪酶活力最大 635 U/mL。温度超过 30 ℃ ,酶活力逐渐降低。故最佳培养温度为 30 ℃。

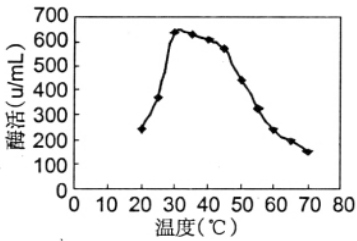


图 2 温度对产酶的影响

Fig. 2 Effect of temperature on lipase production

2.2.2 pH 对菌株产酶的影响

pH 是影响酶活性的重要因素之一 ,酶活性的表达与培养液的带电性有关 ,培养液带电性影响酶分子的结构特异性 ,从而影响了酶的活性。DX213 菌株在 30 ℃ 下不同初始 pH 值培养液中振荡培养 48 h ,测定培养液中的脂肪酶活 ,结果见图 3。从图 3 可知 ,不同初始 pH 值培养液的脂肪酶活随 pH 值(5 ~ 7.5) 的增加而增大 ,其中初始 pH 值为 7.5 时 ,酶

活力最大 ,为 630 U/mL。pH 值超过 7.5 时 ,脂肪酶酶活力显著降低。因此 ,最佳产酶 pH 值为 7.5。

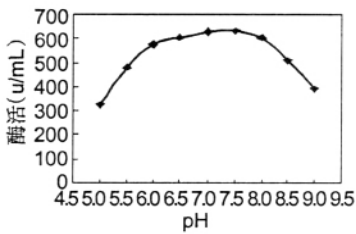


图 3 pH 对产酶的影响

Fig. 3 Effect of pH on lipase production

2.3 脂肪酶酶学性质

2.3.1 pH 值对酶活的影响

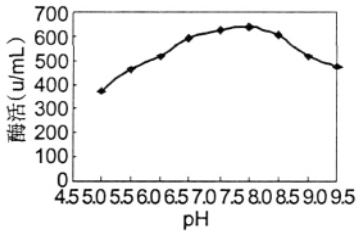


图 4 pH 对脂肪酶酶活力的影响

Fig. 4 Effect of pH on enzymatic activity

取 5 mL 游离脂肪酶酶液 ,不同 pH 值条件下测定脂肪酶酶活 ,结果见图 4 ,从图 4 知 ,pH 5.0 ~ 7.5 时 ,酶活随 pH 值的增加而增大 ,pH 为 7.5 时 ,脂肪酶酶活最大 ,高达 645 U/mL。随 pH 值继续增大 ,脂肪酶活力随着 pH 值的升高而降低 ,可能由于碱条件激活了游离酶蛋白必需基团的电离 ,酶出现水解、脱氨基和外消旋化等现象 ,从而降低酶活^[15-16]。

2.3.2 温度对酶活的影响

取 5 mL 游离脂肪酶酶液 ,不同温度条件下测定脂肪酶酶活 ,结果见图 5 ,从图 5 知 ,在温度 25 ~ 40 ℃ 时 ,酶活力随温度的增加而迅速增大 ,温度为 40

℃时脂肪酶酶活力最大 650 U/mL。温度继续增大, 脂肪酶酶活力随着温度的升高而降低, 可能由于较高温度脂肪酶蛋白部分变性或结构特异性发生变化, 从而降低酶活。

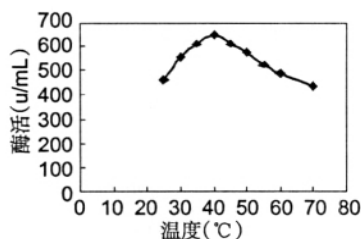


图5 温度对脂肪酶酶活力的影响

Fig. 5 Effect of temperature on enzymatic activity

2.3.3 脂肪酶热稳定性

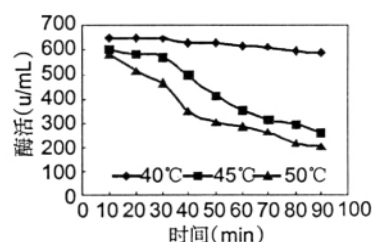


图6 脂肪酶热稳定性

Fig. 6 The thermal stability of the lipase

取 5 mL 游离脂肪酶酶液, 在 40、45 ℃ 和 50 ℃ 条件下将酶液保温, 每隔 10 min 取保温酶液, 在 pH 7.5 磷酸缓冲溶液中, 测定脂肪酶活, 结果见图 6。40 ℃ 保温 90 min 时其脂肪酶酶活力保持在 600 U/mL 酶活力损失较少。45 ℃ 保温 50 min, 其剩余酶活力为原酶活力的 63.8% 90 min 后剩余酶活力仅为原酶活的 40%。50 ℃ 下脂肪酶的热稳定性较差, 50 min 时其剩余酶活力下降至原酶活力的 46.9%, 90 min 后剩余酶活仅为原酶活的 31.5%。结果可知, 脂肪酶的热稳定性一般, 在低于 40℃ 温度下稳定。

2.3.4 激活剂对脂肪酶的影响

添加激活剂如某些金属离子、多糖、戊醇和表面活性剂于反应环境中可影响酶的氢键、静电作用、疏水作用等, 针对不同的酶可用不同的离子或化合物来稳定酶的构象。Fe³⁺ 浓度对酶活力的影响见图 7。从图 7 可知, 当 Fe³⁺ 浓度较低时, 随着 Fe³⁺ 浓度的增加, 脂肪酶酶活力有较大幅度的提高, Fe³⁺ 浓度为 0.03 g/mL 时, 脂肪酶酶活力高达 720 U/mL。但当 Fe³⁺ 浓度继续增高时, Fe³⁺ 对脂肪酶的活性起到

抑制的作用, 脂肪酶的酶活力反而下降。由此可知, Fe³⁺ 浓度为 0.03 g/mL 时, 对游离脂肪酶的激活效应最高。

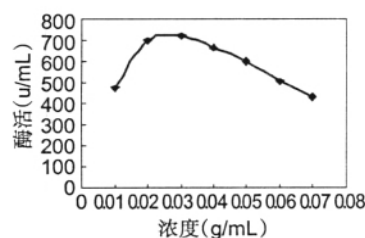


图7 Fe³⁺对脂肪酶酶活力的影响

Fig. 7 Effect of Fe³⁺ concentration on enzymatic activity

3 结论

3.1 面包干酵母为出发菌株, 对其进行紫外和微波复合诱变, 得高产突变菌株 DX213, 高产突变菌株酶活力为 635 U/mL, 为出发菌株的 1.69 倍。菌株连续培养 5 代, 遗传性状稳定。

3.2 DX213 菌株的最优产脂肪酶条件为: 培养温度 30 ℃ 和培养液 pH 7.5。

3.3 脂肪酶的最适温度 40 ℃、最适 pH 为 7.5、脂肪酶在 40 ℃ 以下稳定。Fe³⁺ 离子对脂肪酶有激活效应, 当 Fe³⁺ 离子浓度为 0.03 g/mL 时, 脂肪酶酶活力高达 720 U/mL。

参考文献

- 1 Zeng HY, Feng Z, Deng X *et al.* Activation of Mg-Al hydro-talcite catalyst for transesterification of rapeseed oil. *Fuel*, 2008 87: 3071-3075.
- 2 Zeng HY, Deng X, Wang YJ, *et al.* Preparation of Mg-Al hydrotalcite by urea method and its catalytic activity for transesterification. *American Ins Chem Eng*, 2009 55: 1229-1235.
- 3 Deng X(邓欣), Zeng HY(曾虹燕), Feng Z(冯震). The preparation mechanism and anti-toxicity study on Nanocrystalline Mg-Al hydrotalcite. *J Funct Mater* (功能材料), 2007 38: 965-971.
- 4 Zeng HY(曾虹燕), Deng X(邓欣), Liao KB(廖凯波) *et al.* Properties of immobilized lipase on Nanocrystalline Mg-Al hydrotalcite. *Chem React Eng Technol* (化学反应工程与工艺) 2008 24: 455-460.
- 5 Deng X(邓欣), Zeng HY(曾虹燕), Feng B(冯波). Optimization preparation of biodiesel on immobilized lipase catalyst. *Nat Prod Rre Dev* (天然产物研究与开发) 2008 20:

- 113-116.
- 6 Liao KB(廖凯波) ,Zeng HY(曾虹燕) ,Deng X(邓欣) *et al.* Optimized process of biodiesel on immobilized lipase catalyst assisted with ultrasonic radialization in microaqueous media. *Nat Prod Rre Dev*(天然产物研究与开发) ,2009 ,21: 871-874.
 - 7 Liang B(梁斌) ,Min EE(闵恩泽) . Developing biodiesel production based on the renewable resource of west China. *J Sichuan Univ Eng Sci*(四川大学学报,工程版) ,2006 ,38: 33-57.
 - 8 Deng X(邓欣) ,Zeng HY(曾虹燕) ,Feng Z(冯震) *et al.* Discussion on crystallization kinetics of nano-crystalline Mg-Al hydrotalcite. *J Funct Mater*(功能材料) ,2008 ,39: 341-345.
 - 9 Zeng HY ,Deng X. Characterization of the lipase immobilization on Mg-Al LDH for biodiesel. *Proc Biochem* ,2009 ,44: 791-798.
 - 10 Deng X(邓欣) ,Fang Z(方真) ,Hu YF(胡远飞) *et al.* Preparation of biodiesel on nano Ca-Mg-Al solid base catalyst under ultrasonic radiation in microaqueous media. *Petrochem Technol*(石油化工) ,2009 ,38: 1074-1078.
 - 11 Deng X(邓欣) . Microstructure controllable preparation and application of Nanocrystalline Mg-Al hydrotalcite (master degree paper) . Xiangtan: Xiangtan University ,College of Chemical Engineering 2007.
 - 12 Zeng HY(曾虹燕) ,Deng X(邓欣) ,Feng Z(冯震) *et al.* The method for biodiesel production. CN101029243A.
 - 13 Deng X ,Fang Z ,Zeng HY *et al.* A continuous instrument for biodiesel production. CN 201280541Y.
 - 14 Liu RC(刘仁春) ,Wu XY(吴晓英) ,Fan YW(范一文) *et al.* Mutation breeding of high yield lipase strains and study of properties of lipase. *Biotechnology*(生物技术) ,2008 ,18: 26-29.
 - 15 Huang J(黄娟) ,Chen ZJ(陈正杰) ,Feng J(冯军) *et al.* Induced mutagenesis of lipstrain producing strain by ultraviolet ray and microwave. *Chin J Pharm*(中国医药工业杂志) ,2006 ,37: 12-14.
 - 16 Huang JH ,Liu YX ,Jin QZ *et al.* Compound lipase catalyzed hydrolysis of soybean oil in a solvent free system. *China oils fats*(中国油脂) ,2009 ,34: 55-59.

(上接第 493 页)

- 7 Asano N ,Yamashitq T ,Yasuda K *et al.* Polyhydroxylated alkaloids isolated from mulberry trees (*Morus alba* L.) and silkworms (*Bombyx mori* L.) *J Agric Food Chem* 2001 ,49: 4208-4213.
- 8 Yang M(杨梅) ,Liu YM(刘玉明) ,Gao RC(高瑞昶) . Determination of DNJ in *Morus alba* L. leaves by HPLC. *Med J Chin PAPF*(武警医学) ,2007 ,18: 121-124.
- 9 Liang JN(梁建宁) ,Chen ZS(陈正收) ,Wu L(吴璐) *et al.* HPLC-ELSD determination of 1-deoxynojirimycin in *Cortex Mori*. *Chin Tradit Pat Med*(中成药) ,2007 ,29: 1654-1657.
- 10 Egan MJ ,Kite GC ,Porter EA *et al.* Electrospray and APCI analysis of polyhydroxyalkaloids using positive and negative collision induced dissociation experiments in a quadrupole ion trap *Analyst* 2000 ,125: 1409-1414.
- 11 Kite GC ,Porter EA ,Egan MJ *et al.* Rapid detection of polyhydroxyalkaloid mono- and diglycosides in crude plant extracts by direct quadrupole ion trap mass spectrometry. *Phytochem Anal* ,1999 ,10: 259-263.
- 12 Keiner R ,Dräger B. Calystegine distribution in potato (*Solanum tuberosum*) tubers and plants. *Plant Sci* 2000 ,150: 171-179.
- 13 Guan LP(关丽萍) ,Zheng GH(郑光浩) ,Jin QH(金晴昊) *et al.* Determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves in different resources and different collect times by RP-HPLC. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药) . 2005 ,36: 1881-1882.
- 14 Ouyang Z(欧阳臻) ,Chen J(陈钧) . Determination of 1-deoxynojirimycin in *Morus alba* L. leaves in different seasons. *Food Sci*(食品科学) 2004 ,25: 211-213.
- 15 Ouyang HX(欧阳华学) ,Li YQ(黎源倩) ,Xiao QW(肖全伟) . Determination of 1-deoxynojirimycin in *Morus alba* L. leaves by HPLC. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药) ,2007 ,38: 774-776.
- 16 Kimura T ,Nakagawa K ,Saito Y *et al.* Determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves using hydrophilic interaction chromatography with evaporative light scattering detection. *J Agric Food Chem* 2004 ,52: 1415-1418.
- 17 Mellor HR ,Adam A ,Platt FM *et al.* High-performance cation-exchange chromatography and pulsed amperometric detection for the separation ,detection and quantitation of N-alkylated imino sugars in biological samples. *Anal Biochem* ,2000 ,284: 136-142.