



产脂肪酶菌株 *Acinetobacter calcoaceticus* UN9 的诱变选育

王海宽, 钟少炯, 石景, 戚薇

(工业微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 本实验菌株醋酸钙不动杆菌 (*Acinetobacter calcoaceticus*) M1-7 的最佳紫外诱变时间为 60 s. 利用紫外诱变后涂布到添加不同脂肪酶底物和分解产物的分离培养基, 筛选出具有抗性的正突变株. 其中柠檬酸钠抗性突变菌株 UN9 最高酶活力达 15.960 U/mL, 比出发菌株提高了 130.97%, 远远高于琥珀酸钠、正丁酸、正己酸、三丁酸甘油酯等抗性突变菌株. 经 5 次传代后, 菌株 UN9 遗传性能稳定, 平均酶活力为 15.866 U/mL.

关键词: 脂肪酶; 醋酸钙不动杆菌; 紫外诱变; 抗性突变菌株; 酶活力

中图分类号: Q933 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2010)06-0001-04

Mutation Breeding of Lipase-Producing Strain *Acinetobacter calcoaceticus* UN9

WANG Hai-kuan, ZHONG Shao-jiong, SHI Jing, QI Wei

(Key Laboratory of Industrial Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology,
Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The best time for UV-mutation of *Acinetobacter calcoaceticus* M1-7 is 60 s. And the target resistant mutants are screened on media containing lipase substrate and product. The highest enzyme activity identified from a sodium citrate resistant mutant strain UN9 is 15.960 U/mL, a yield increase of 130.97% compared with the starting strain, far higher than those from resistant mutants to other classes, such as sodium succinate, butyrate acid, caproic acid and butyrins. The genetic stability of strain UN9 is high based on results from five generations of propagation, and its average lipase activity is 15.866 U/mL.

Keywords: lipase; *Acinetobacter calcoaceticus*; UV-mutation; resistant mutant strain; enzyme activity

脂肪酶 (lipase, EC3.1.1.3) 即三酰基甘油酰基水解酶, 是一类重要的甘油酯键水解酶, 可以在油水界面上催化天然底物油脂水解生成脂肪酸和甘油, 以及中间产物甘油单酯和甘油二酯^[1]. 微生物脂肪酶一直以来就受到广泛的重视^[2], 其种类多, 具有比动植物脂肪酶更广的反应 pH、适宜的温度范围和更强的底物专一性^[3], 在洗涤剂、食品、化工、医药等行业有广泛的用途^[4]. 目前国外研究比较成熟, 最新报道的日本曲霉 (*Aspergillus japonicus*) 脂肪酶最高酶活力可达 120 U/mL (p-NPP 法测定)^[5]. 脂肪酶和其他水解

酶类一样受终点产物或分解代谢物阻遏的调节. 因此, 通过添加琥珀酸钠等脂肪酶底物和分解产物^[6]来筛选抗阻遏突变菌株, 可以更加有效地筛选到脂肪酶高产菌.

1 材料与方法

1.1 菌株

醋酸钙不动杆菌 (*Acinetobacter calcoaceticus*) M1-7, 实验室自筛菌株.

收稿日期: 2010-07-06; 修回日期: 2010-09-10

基金项目: 天津市自然科学基金资助项目 (09JCZDJC17800)

作者简介: 王海宽 (1974—), 男, 内蒙古人, 教授, 博士; 通信作者: 戚薇, 教授, 博士生导师, Qiwei@tust.edu.cn.

1.2 培养基(g/L)

1.2.1 种子培养基

酵母浸出粉 5, 蛋白胨 10, NaCl 10, pH 8.0, 121 °C 灭菌 20 min.

1.2.2 初筛(分离)培养基

K_2HPO_4 1, $NaNO_3$ 3, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, KCl 0.5, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, 琼脂粉 20, pH 8.0. 121 °C 灭菌 20 min, 降温至 50 °C 左右, 加 2% 聚乙烯醇-橄榄油乳化液(含 0.2% 的维多利亚蓝 B), 分别加入不同浓度琥珀酸钠、柠檬酸钠、正丁酸、正己酸、三丁酸甘油酯混匀后倒平板.

1.2.3 发酵培养基

$NaNO_3$ 5, 黄豆饼粉 20, 玉米粉 10, K_2HPO_4 1, 橄榄油 10, pH 8.0, 121 °C 灭菌 20 min.

1.2.4 传代培养基

酵母浸出粉 5, 蛋白胨 10, NaCl 10, 琼脂粉 20, pH 8.0, 121 °C 灭菌 20 min.

1.3 溶液

聚乙烯醇-橄榄油乳化液^[7-8]: 将 20 g 聚乙烯醇(聚合度 1759 ± 50) 加入 800 mL 蒸馏水中, 加热沸腾溶解, 冷却后定容至 1 000 mL, 配成 2% 的聚乙烯醇溶液. 按 1 : 3 的比例将橄榄油与上述 2% 的聚乙烯醇溶液混匀; 用高速匀浆机 10 000 r/min 处理 3 min, 间隔 5 min, 重复 2 ~ 3 次, 配成乳白色聚乙烯醇-橄榄油乳化液.

1.4 脂肪酶活力测定方法

1.4.1 维多利亚蓝透明圈法^[9]

用 2% 聚乙烯醇-橄榄油乳化液作为底物, 维多利亚蓝 B 作为指示剂, 在初筛培养基上涂布菌液, 37 °C 培养 24 h, 观察其出圈大小以判断酶活力. 挑选出圈明显的菌株进行发酵复筛, 即挑选透明圈直径与菌落直径的比值大的菌株.

1.4.2 p-NPP 比色法^[10-11]

溶液 A: 将 30 mg 对棕榈酸硝基苯酯(p-NPP) 溶于 10 mL 异丙醇中. 溶液 B: 将 90 mL 浓度为 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 8.0) 加入 1% 的 Triton X-100. 溶液 A 和溶液 B 按 1 : 9 缓慢混合成溶液 C.

取 1.9 mL 溶液 C 于 40 °C 预热, 然后加入 0.1 mL 已稀释一定倍数的粗酶液(即将发酵液在 4 °C 离心 10 min 后取上清液), 在 40 °C 保温反应 15 min 后放置于 -4 °C 冷冻 10 min 终止反应. 以每孔 200 μ L 加入 96 孔酶标板孔中. 用酶标仪在波长 400 nm 下测定溶液中已释放对硝基苯酚量(以不加酶的溶液作对照). 在 pH 8.0、40 °C 条件下, 每分钟分解 1 mL 底物对棕榈酸硝基苯酯(p-NPP), 释放 1 μ mol 对硝基苯酚

(p-NP) 所需酶量定义为 1 个脂肪酶活力单位, 以 U/mL 表示.

1.5 抗性突变株的筛选

1.5.1 菌株 M1-7 对部分脂肪酶底物和分解产物的最大耐受剂量

制备含有不同浓度的脂肪酶底物和分解产物(琥珀酸钠、柠檬酸钠、正丁酸、正己酸、三丁酸甘油酯)培养基, 取活化后的菌液稀释后涂平板, 37 °C 培养 24 h 后, 观察其生长情况.

1.5.2 诱变方法^[12]

液体种子(LB) 培养至对数中期(约 6 h), 取 2% 转接于 50 mL 的 LB 培养基中, 培养至对数中期, 4 000 r/min 离心 10 min 后用相同体积的生理盐水洗涤 2 次, 然后悬浮于 50 mL 生理盐水, 取 10 mL 于灭菌平皿($d = 70$ mm) 中备用.

照射前先开紫外灯 20 min, 使光波稳定, 同时消毒照射箱内. 把盛有菌液的平皿($d = 70$ mm) 放置在距离灯管(15 W, $\lambda = 260$ nm) 30 cm 下, 打开平皿盖进行照射, 照射时用振荡器或电磁搅拌器缓慢搅动, 使之均匀接受照射. 照射后避光操作连续涂布于维多利亚蓝初筛平板, 用黑布包好, 避光培养于 37 °C 培养箱, 24 h 后观察结果. 挑取透明圈明显的菌落划线于 LB 平板, 待菌体长好后发酵培养, 参照 1.4.2 p-NPP 比色法测定脂肪酶活力.

紫外诱变剂量的确定: 在固定照射距离的条件下, 改变照射时间, 分别照射菌体 15、30、45、60、75、90、105、120 s. 按照紫外诱变方法进行操作, 并对诱变前后菌体进行活菌计数, 选取合适的致死率照射时间进行后续实验.

紫外诱变处理及突变株的筛选: 按照确定的诱变条件对菌株进行紫外诱变, 每批先用平板扩散法筛选出 30 ~ 40 株突变株, 再继续发酵用分光光度法从中选出酶活力提高较大的正突变株继续诱变.

1.6 遗传稳定性实验

筛选出产酶最高的菌株在传代培养基连续传代 5 次, 于 37 °C 培养 24 h, 将各代菌株接种到发酵培养基培养后测定其各代酶活力, 并比较各代酶活力变化.

2 结果与讨论

2.1 菌株 M1-7 对部分脂肪酶底物和分解产物的最大耐受剂量

制备含有不同浓度的脂肪酶底物和分解产物(琥珀酸钠、柠檬酸钠、正丁酸、正己酸、三丁酸甘油酯)培

培养基,取活化后的菌液稀释后涂平板,37℃培养 24 h 后,观察其生长情况,结果见表 1.

表 1 *Acinetobacter calcoaceticus* M1-7 对部分脂肪酶分解产物和底物的最大耐受剂量

Tab.1 Maximum tolerated dose to some lipase substrate and product for *Acinetobacter calcoaceticus* M1-7

琥珀酸钠	柠檬酸钠	正丁酸	正己酸	三丁酸甘油酯
10 g/L	15 g/L	2.0 mL/L	1.0 mL/L	10 mL/L

由表 1 可知,不同脂肪酶底物和分解产物浓度抑制该菌株生长和产酶的程度不同.而当浓度达到一定时,即最大耐受剂量,该菌株几乎无法生长或无法产酶.

2.2 紫外诱变

相同紫外诱变剂量处理的条件下,照射不同时间对菌体的致死率是不相同的.由图 1 可知,当照射时间达到 120 s 时,菌株 *Acinetobacter calcoaceticus* M1-7 的紫外诱变致死率已接近 100%,说明该菌对紫外线比较敏感;当照射时间达到 60 s 时,致死率为 89.83%,与根据实验结果计算致死率在 70%~90%时都有利于正突变发生的结果比较接近,因此,根据图 1 诱变 60 s 时致死率为 89.83%,实验最终确定以紫外处理 60 s 进行诱变.

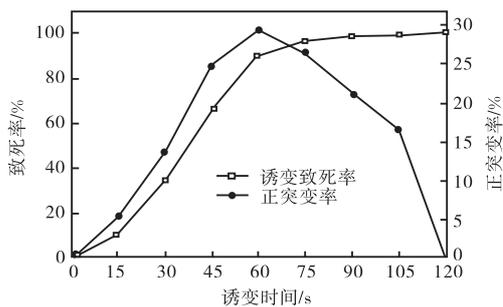


图 1 *Acinetobacter calcoaceticus* M1-7 的紫外诱变致死率
Fig.1 Death rate of *Acinetobacter calcoaceticus* M1-7 by UV radiation

2.3 突变株的筛选结果

脂肪酶水解油脂过程中,产物中甘油二酯、甘油单酯、甘油、脂肪酸是混合在一起的^[13],各自对菌株产脂肪酶起到阻遏作用.

本实验选取紫外照射时间 60 s,诱变处理后涂布到添加不同脂肪酶底物和分解产物的分离培养基进行筛选,各自经初筛后进行发酵培养复筛,其中柠檬酸钠抗性突变菌株酶活力达到 15.960 U/mL,比出发菌株酶活力 6.910 U/mL 提高 130.97%,且远远高于其他抗性菌株(其次为正己酸、正丁酸抗性突变菌株,其酶活力增幅不足 100%).如图 2 所示,表明选用合适的底物或分解产物辅助筛选,可以更加有效地筛选到高产脂肪酶菌株.

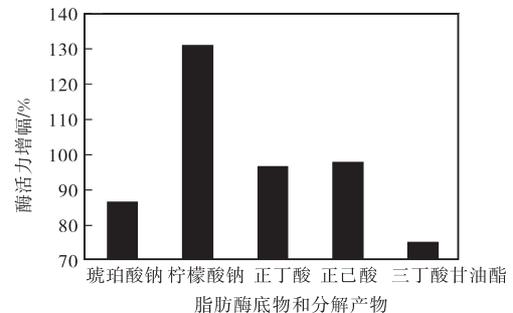


图 2 紫外诱变后涂布到添加不同脂肪酶底物和分解产物的培养基的筛选效果比较

Fig.2 Comparison of the mutants screened on media containing lipase substrate and decomposed product after UV-mutation

2.4 遗传稳定性

将柠檬酸钠抗性突变菌株中产酶量最大菌株的编号为 UN9,其酶活力为 15.960 U/mL,进行遗传稳定性的研究.实验结果如图 3 所示.

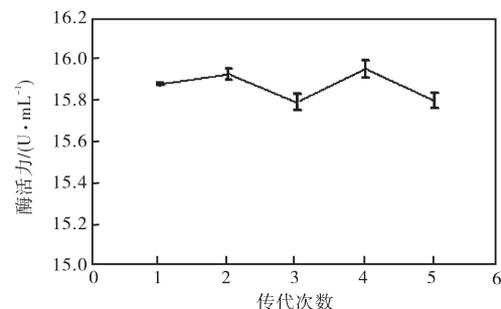


图 3 突变株 UN9 传代 5 次后各代产酶结果

Fig.3 Lipase activity from per generation of the strain UN9 based on five generations of propagation

将柠檬酸钠抗性突变菌株 UN9 在传代培养基上连续传代 5 次后接种到发酵培养基中,摇瓶发酵后测酶活力,实验测得数据如图 3 所示.表明其具有遗传稳定性,平均脂肪酶活力达到了 15.866 U/mL.

3 结论

本实验确定了最佳紫外诱变时间为 60 s,利用紫外诱变后涂布到添加不同脂肪酶底物和分解产物的培养基,对实验室保藏的一株碱性脂肪酶产生菌醋酸

钙不动杆菌 (*Acinetobacter calcoaceticus*) M1-7 进行筛选,最终筛选出具有抗性的正突变株. 其中柠檬酸钠抗性突变菌株 UN9 最高酶活力达 15.960 U/mL,比出发菌株 M1-7 提高了 130.97%,远远高于琥珀酸钠、正丁酸、正己酸、三丁酸甘油酯等抗性突变菌株. 初步估计是该菌株产的脂肪酶的底物和分解产物结构或性质与柠檬酸钠更为接近,在终点产物或分解代谢物阻遏的调节方面更加显著,能更有效筛选出高产脂肪酶菌株. 菌株 UN9 经 5 次传代后平均酶活力为 15.866 U/mL. 表明选用合适的底物或分解产物辅助筛选,可以更加有效地筛选到高产脂肪酶菌株.

参考文献:

- [1] Sarda L, Desnuelle P. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1958, 30(3): 513-521.
- [2] 张敏, 黎继烈, 蒋丽娟, 等. 脂肪酶产生菌的紫外诱变选育[J]. *河南科技学院学报*, 2009, 37(4): 22-25.
- [3] 刘海洲, 刘均洪, 张媛媛, 等. 微生物脂肪酶的最新应用研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2009, 30(1): 141-143.
- [4] 高贵, 韩四平, 王智, 等. 国内脂肪酶研究状况分析[J]. *生物技术通讯*, 2003, 14(6): 543-545.
- [5] Jayaprakash A, Ebenezer P. Investigation on extracellular lipase production by *Aspergillus japonicus* isolated from the paper nest of *Ropalidia marginata*[J]. *Indian Journal of Science and Technology*, 2010, 3(2): 113-117.
- [6] 章文贤, 蒋咏梅, 周晓兰, 等. 抗性突变株筛选法选育碱性脂肪酶高产菌[J]. *工业微生物*, 2001, 31(2): 14-16.
- [7] 闫丽娟, 赵春雷, 谢振荣, 等. 脂肪酶产生菌 *Aspergillus niger* NJY-1 的选育及鉴定[J]. *生物技术*, 2009, 19(6): 17-20.
- [8] 刘瑞娟, 王海宽, 路福平, 等. 低温碱性脂肪酶产生菌的筛选及产酶培养基的优化[J]. *天津科技大学学报*, 2009, 24(1): 6-10.
- [9] 高修功, 曹淑桂. 脂肪酶产生菌的选育及产酶条件的优化[J]. *微生物学报*, 1998, 38(4): 313-317.
- [10] Vorderwülbecke T, Kieslich K, Erdmann H. Comparison of lipases by different assays[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1992, 14(8): 631-639.
- [11] Winkler U K, Stuckmann M. Glycogen, hyaluronate and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1979, 138(3): 663-670.
- [12] 周欣, 吕淑霞, 代义, 等. 紫外诱变选育木聚糖酶高产菌株及产酶条件初步研究[J]. *生物技术*, 2009, 19(1): 71-74.
- [13] 高贵. 扩展青霉脂肪酶的固定化及油脂水解产物成分分析[D]. 吉林: 吉林大学, 2004.