

# 假单胞菌产脂肪酶条件的初步探索

高修功 章克昌

(无锡轻工大学生物工程系, 无锡 214036)

曹淑桂 年燕兰

(吉林大学酶工程国家重点实验室, 长春 130023)

**摘要** 对假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) 2106 菌株产脂肪酶条件的初步探索表明, 该菌株脂肪酶为组成型, 不受油脂类底物的诱导。碳源的种类(单糖、双糖、多糖)和浓度对产酶影响不大, 氮源以豆饼粉和玉米浆混合添加最好。最适发酵温度为 32℃, 摇瓶转速 140r/min。实验中还通过正交试验优化了产酶培养基组成。

**关键词** 脂肪酶, 假单胞菌, 诱导

近年来, 非水相酶学的深入研究大大拓展了脂肪酶的应用领域, 利用脂肪酶在有机相中所催化的各种反应可以合成许多高价值产品<sup>[1]</sup>。研究表明, 在各种来源的脂肪酶中, 以细菌假单胞菌菌株所产脂肪酶在有机相中催化反应的类型最多、反应活性及稳定性最高<sup>[2]</sup>。然而我国有关细菌脂肪酶的研究报道甚少<sup>[3]</sup>。

为了推动非水相酶催化在我国的研究与应

用, 有必要开发出适于非水相作用的脂肪酶品种。作者曾报道过从土壤中筛选出一株具有一定产脂肪酶能力的假单胞菌菌株<sup>[4]</sup>。本文报道对该菌株产酶条件的初步研究结果。

---

\* 山东轻工业学院食品工程系, 济南250100

1996-06-20收稿

# 1 材料与方法

## 1.1 主要试剂

聚乙烯醇(PVA): 聚合度  $1750 \pm 50$ , 上海石化水处理厂; 橄榄油: 化学纯, 上海化学试剂供应站; 豆饼粉和玉米浆由无锡酶制剂厂提供, 其它试剂均为国产分析纯或化学纯。

## 1.2 主要仪器

酸度计: pH8-3C型, 上海雷磁仪器厂; 高速组织捣碎机: DS-1型, 上海标本模型厂。

## 1.3 菌种

*Pseudomonas* sp.2106: 从土壤中筛选出的野生菌株<sup>[4]</sup>。 *Ps.* sp. ATCC 21808, *Ps. aeruginosa* ATCC 19154, *Ps. aeruginosa* AHU 1718, *Ps. fluorescens* AHU 1143, *Ps. fluorescens* AS 1.33 均为无锡轻工大学生物工程系菌种保藏室保藏菌种。

## 1.4 发酵产酶

1.4.1 初始培养基(%): 豆饼粉 2.0, 玉米浆 2.0, 可溶性淀粉 1.0,  $K_2HPO_4$  0.5,  $NaNO_3$  0.5, pH9.0, 250ml 三角瓶装液 30ml, 0.1MPa 灭菌 20min。

1.4.2 培养方法: 挑取一环新鲜的肉汁脓斜面种子, 接入肉汁脓液体种子培养基中, 30℃、150r/min 下培养 24h。然后取 1ml 液体种子于发酵产酶培养基中, 在一定的温度和摇床转速下摇瓶发酵 72h。发酵液离心 (3000r/min, 20min), 取上清液供测定酶活。

1.4.3 脂肪酶水解活力测定: 橄榄油乳化法<sup>[5]</sup>。以在 40℃、pH9.0 的条件下, 水解橄榄油每 min 产生  $1\mu\text{mol/L}$  游离脂肪酸所需的酶量定义为一个酶活单位 (u)。

# 2 结果与讨论

## 2.1 2106 菌株与已知菌产酶情况比较

对 2106 菌株产酶能力与假单胞菌属几株已知菌进行了比较, 结果见表 1。

2106 株的产酶能力较所试的几株已知菌均高, 在最高产酶时间及发酵液 pH 值方面差异不大。

表 1 2106 菌株与假单胞菌属几株已知菌产脂肪酶能力比较\*

菌株	pH	最大产酶 (u/mL)	时间 (h)
2106	8.3	12.1	72
ATCC 19154	8.0	7.4	60
ATCC 21808	8.0	3.9	84
AHU 1718	7.5	1.4	60
AHU 1143	7.8	1.3	72
AS 1.33	7.6	0.9	72

\* 所用培养基为发酵产酶培养基

## 2.2 在几种常用产脂肪酶培养基中的产酶比较

将 2106 菌株在几种常用产脂肪酶培养基上的产酶情况进行了比较, 以期选择出一种出发培养基供进一步优化产酶条件用。从表 2 可以看出, 2 号培养基产酶量最高; 其碳源为可溶性淀粉, 氮源为豆饼粉与玉米浆, 适合于大规模工业化生产用, 因此选用该培养基作进一步研究。

## 2.3 2106 菌株脂肪酶合成影响因素探讨

2.3.1 油脂、脂肪酸脂、及脂肪酸对产酶的影响: 为确定 2106 菌株所产脂肪酶为组成型还是

表 2 4 种培养基组成及产酶情况比较

培养基 (%)	1 <sup>[6]</sup>	2 <sup>[6]</sup>	3 <sup>[6]</sup>	4 <sup>[7]</sup>
豆饼粉	2.0	2.0		1.5
玉米浆		2.0	3.0	3.0
尿素	0.1		0.5	
葡萄糖			1.0	0.5
可溶性淀粉	2.0	1.0		
$K_2HPO_4$	0.5	0.5	0.2	
$NaNO_3$		0.5		
$(NH_4)_2SO_4$	0.1			
KCl			0.05	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1		0.05	
大豆油			1.0	0.75
硫代乙酰胺				0.05
接种前	10.0	10.0	7.0	8.5
发酵后	9.2	9.0	6.6	8.0
最高酶活 (u/mL)	13.6	20.8	15.3	12.1

诱导型, 实验中选用上述2号培养基为基础培养基, 添加不同种类与数量的油脂、脂肪酸酯及脂肪酸, 观察对产酶的影响。由实验结果(表3)可以初步认为, 2106菌株在不存在任何诱导物的情况下仍产生较高的酶活, 其所产脂肪酶可能为组成型; 另外, 在实验所采用的浓度范围内, 天然油脂、合成油脂及脂肪酸酯均对产酶无明显影响。但短链脂肪酸( $n < 12$ )在较高浓度下对产酶有一定的抑制作用, 且碳链越短、浓度越高抑制作用越明显。

表3 油脂、脂肪酸酯及脂肪酸对产酶的影响

用量(%)	0	0.05	0.20	2.00
牛油	21.5	20.7	21.2	21.4
猪油	21.5	20.7	20.4	19.7
豆油	21.5	22.1	22.1	21.8
棕榈油	21.5	21.3	20.3	20.5
橄榄油	21.5	20.9	20.6	22.2
三油酸甘油酯	21.5	21.2	20.7	23.1
三丁酸甘油酯	21.5	23.1	22.2	21.7
硬脂酸甲酯	21.5	22.7	22.2	22.3
油酸甲酯	21.5	21.2	21.2	22.1
丁酸甲酯	21.5	20.5	21.2	20.8
硬脂酸	21.5	21.2	21.7	22.3
油酸	21.5	20.2	19.6	19.9
棕榈酸	21.5	20.2	20.3	20.1
月桂酸	21.5	18.7	17.7	17.2
辛酸	21.5	16.2	15.8	14.9
丁酸	21.5	15.7	13.5	12.7

2.3.2 碳源的影响: 选取不同种类与浓度的碳源, 代替2号培养基中的可溶性淀粉(1.0%), 观察对产酶的影响。结果(表4)表明, 碳源的种类与浓度对产酶无明显影响, 而且当培养基中无特别添加的碳源时, 产酶亦不受影响。

2.3.3 氮源的影响: 对几种无机氮源、有机氮源及其不同组合对产酶的影响进行了研究。结果(表5)表明, 氮源以豆饼粉和玉米浆混合添加效果最好。在所用的几种氮源中, 添加单一的无机氮源或有机氮源时产酶均较低, 而将无

表4 碳源对产酶的影响

碳源	浓度	酶活	浓度	酶活
	(%)	(u/ml)	(%)	(u/ml)
对照	0	21.8		
葡萄糖	1.1	18.2	2.2	23.2
蔗糖	1.1	18.4	2.1	21.2
可溶性淀粉	1.0	18.5	2.0	22.4
玉米粉	1.4	16.2	2.7	17.6
山芋粉	1.3	15.8	2.6	17.2

表5 氮源对产酶的影响

氮源	用量(%)	酶活(u/mL)
硫酸铵	0.5	7.2
豆饼粉	4.0	9.0
硫酸铵	0.1	
豆饼粉	2.0	13.7
尿素	0.5	8.2
玉米浆	4.0	11.2
尿素	0.1	
豆饼粉	2.0	14.7
豆饼粉	2.0	
玉米浆	2.0	19.7

机氮源与有机氮源混合添加时产酶相对较高。

2.3.4 发酵温度的影响: 在28℃至38℃范围内试验温度对产酶的影响, 结果表明发酵的适宜温度范围在30~34℃之间, 以32℃最佳。

2.3.5 摇瓶转速的影响: 随着摇瓶转速的增加, 产酶也不断增加; 转速增至140r/min时, 酶活达到最高, 进一步增加转速对产酶无明显影响。静止培养时, 酶活仅为最高产酶的20%左右。增加摇瓶转速可以提高溶氧量, 进而有利于脂肪酶的产生<sup>[6]</sup>。

## 2.4 正交试验优化培养基组成

实验中取可溶性淀粉1.0%、NaNO<sub>3</sub>0.5%, 采用正交试验考察了玉米浆、豆饼粉和K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>对产酶的影响。结果(表略)表明, 这三个因素的最佳水平与出发培养基相同, 分别为2.0%、

2.0%和0.5%，即优化后的组成与出发培养基相同。另外，豆饼粉在实验所采取的几个水平上对产酶的影响不显著，可能在较低水平上已经能够提供菌体足够的氮源；相反，玉米浆的影响非常显著，推测可能是玉米浆除含有有机氮源外，还含有大量菌体生长所必需的生长因子。这些生长因子在一定浓度时能够促进生长和产酶，但浓度过高菌体生长过旺而不利产酶。另外， $K_2HPO_4$ 对产酶也有显著的影响，可能该菌株对磷酸根离子有一定的要求。

### 参 考 文 献

[1] Dordick J S. Principles and Applications of Nonaqueous Enzymology, In: Blanch H W, Clark D S.

Applied Biocatalysis (Vol 1), Marcel Dekker Inc, 1991, 1-51.

[2] Mcneil G P, Yamane T. J Am Oil Chem Soc, 1991, 68(1):6-10.

[3] 徐家立. 脂肪酶. 张树政主编.《酶制剂工业(下)》, 北京: 科学出版社, 1984, 655-670.

[4] 高修功, 章克昌, 曹淑桂. 微生物学报, 1996(待发).

[5] Yamada K, Ota Y, Machida H. Nippon Nogeikagaku Kaishi, 1962, 36:860.

[6] 施巧琴. 微生物学通报, 1981, 8(3):108-110.

[7] U. S. Patent, 3 511 753, 1970.

[8] Frost G. M, Moss D A. In: Kennedy J F. Biotechnology (Vol 7a), VCH, 1987, 113-121.

## FACTORS AFFECTING LIPASE PRODUCTION OF A *PSEUDOMONAS* SP. STRAIN

Gao Xiugong Zhang Kechang

(Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Cao Shugui Nian Yanlan

(National Lab. of Enzyme Eng., Jilin Univ., Changchun, 130023)

**Abstract** Factors affecting the lipase fermentation of a *Pseudomonas* strain were investigated. The results showed that the lipase produced by this strain was constitutive, not induced by the triglyceride incorporated in the culture medium. Different kinds and concentrations of carbon source has no significant effect to the lipase yield, ground soybean combined with corn steep liquor was found to be the best among the nitrogen sources test. The optimum fermentation temperature was 32°C, the optimum shaking frequency was 140rpm. The composition of the fermentation medium was optimized by orthogonal test, and was found to be the same with the original one.

**Key words** Lipase, *Pseudomonas* sp., Induction