

微球菌的脂肪酶合成调节

陈守文 徐柔 章克昌

(无锡轻工业大学生物工程学院 无锡 214036)

曾晓波

(华中农业大学食品科技系 武汉 430070)

摘要 本文介绍了微球菌(*Micrococcus* sp.) 1504胞外脂肪酶的代谢调节模式。发现在发酵培养基中,通过补加长链脂肪酸及其油酯,能提高脂肪酶的生产水平,而中、短链脂肪酸及其酯抑制产酶能力;高浓度的葡萄糖抑制产酶能力;补加不同浓度的橄榄油,适宜补加时间也应不同。水洗细胞脂肪酶的合成受橄榄油和油酸诱导,受葡萄糖和甘油阻遏,并发现脂肪酶的分解代谢阻遏主要发生在转录水平上。

关键词 脂肪酶,诱导,阻遏,微球菌

分类号 Q93-936

脂肪酶(Lipase, E.C.3.1.1.3)是催化水解油水界面上的不溶性三酸甘油酯为二酸甘油酯、单酸甘油酯、脂肪酸、和甘油的酯酶。脂肪酶广泛分布在动植物和微生物中,而微生物脂肪酶在食品、洗涤剂、医药、新的有机化合物酶法合成、外旋体拆分、环保等领域的广泛应用以及易于大规模生产等特性而特别受到重视。有关微生物生产脂肪酶受到了广泛的研究。虽然Rapp P.对微生物脂肪酶的诱导组成概括总结了三种类型^[1]。但有关微生物脂肪酶的生理代谢调控研究甚少,本文拟对一株新分离到的微球菌作有关诱导阻遏代谢调控的详细研究。

1 材料和方法

1.1 菌种

微球菌1504,从武汉市某油菜地筛选得到。

1.2 培养基和培养条件

基础发酵培养基(%):玉米浆2.0,豆粕水解液5.0,葡萄糖1,橄榄油0.3, NaNO₃ 0.5, K₂HPO₄ 0.5, pH8.0,每250ml三角瓶分装30ml培养基,0.1MPa灭菌20min。试验时接入供试菌种,30℃,150r/min培养48h,取发酵液离心

(8000r/min,10min),上清液供测试分析。

1.3 脂肪酶活力测定(pNPL法^[2])

取0.5ml pNPL溶液(取80mg对硝基苯月桂酸酯、5ml异丙醇和1ml曲拉通X-100,溶于5mmol/L的pH5.0NaAc-Hac缓冲液并定容至100ml)与0.5ml pH8.5 0.05M的Tris缓冲液混合,加入0.1ml稀释的发酵上清液,45℃反应10min,加1.5ml乙醇中止反应。在波长410nm下测定酶活。在上述条件下每分钟产生1μmol对硝基苯酚所需的酶量定义为一个酶活单位(u)。

1.4 菌体生物量的测定

通过检测发酵液在600nm波长光密度(OD)值,测定生物量。一个生长单位定义为产生OD值一个单位变化的细胞量。

2 结果与分析

2.1 碳源对产酶的影响

许多研究表明,碳源种类对脂肪酶的产生有重要影响。Tsujijsaka Y.等^[3]发现,易被水解的长链脂肪酸、油以及司班80是*Geotrichum Candidum*脂肪酶诱导物,其中橄榄油诱导效果

最佳;难被分解的短链脂肪酸酯和吐温 80 对酶的形成无效果。谢舜珍^[4]等发现液态油和长链脂肪酸有利于 *G. sp. AS2. 1135* 产脂肪酶。Jane G. E.^[5]等发现 *Pseudomonas aeruginosa* EF2 受脂肪酸酰基酯强烈诱导(吐温 80、85 作用效果最佳),受油酸阻遏。Espinosa E.^[6]等发现 *Rhizopus Delemar* CDBB H313 脂肪酶似乎不是诱导酶,但油有加强酶生成的效果。Okeke C. N.^[7]等发现木糖是 *Acremonium strictum* 脂肪酶生成的最有效碳源。为考察碳源对 1504 菌株产酶的具体影响,实验选用不同种类的糖类、脂肪酸及脂肪酸酯替代基础发酵培养基中的碳源,观察不同碳源对产酶的影响,结果见表 1。

表1 碳源对产酶的影响

碳源 (1% W/V)	终pH	脂肪酶 (u/ml)	生物量
对照	8.5	0.22	1.75
蔗糖	9.0	1.64	1.75
葡萄糖	8.5	2.03	4.90
甘油	8.5	0	2.08
三油酸甘油酯	8.0	0.94	11.00
橄榄油	8.0	1.10	10.1
豆油	7.5	5.38	8.50
三丁酸甘油酯	5.5	0	1.95
吐温80	8.3	0.90	2.6
司班60	8.5	1.09	2.25
硬脂酸	8.5	12.4	5.75
油酸	8.0	14.3	6.39
棕榈酸	8.5	2.01	4.28
月桂酸	8.0	0	3.00
辛酸	7.0	0	1.05
丁酸	5.5	0	0.28

从表 1 中的数据可得结论: 1) 糖类对产酶有一定作用; 甘油对产酶有阻遏作用; 而补加一定量的橄榄油到培养基中产酶明显提高, 说明橄榄油对 1504 菌株产酶可能有诱导作用。2) 脂肪酸中十八碳脂肪酸如油酸和硬脂酸急剧促进产酶, 十六碳酸如棕榈酸对产酶有一定促进作用, 中短链脂肪酸如月桂酸、辛酸、丁酸对产酶有抑制作用。3) 各长链脂肪酸酯对产酶有小

幅度提高, 成分较复杂的豆油则对产酶有明显促进作用, 而三丁酸甘油酯对产酶有抑制作用。

2.2 葡萄糖和橄榄油对产酶的影响

表 1 数据表明葡萄糖和橄榄油对产酶有明显影响, 为考察不同浓度葡萄糖和油脂对产酶的影响, 1) 在基础发酵培养基中, 调整不同葡萄糖浓度(浓度变化从 0.5% 至 5%), 观察不同葡萄糖浓度对发酵的影响。结果表明葡萄糖浓度在 2% 时菌体生长最好, 且产酶较高, 随着葡萄糖浓度的增加, 酶活急剧降低, 说明葡萄糖浓度过高会阻遏产酶。2) 在基础发酵培养基中, 调整橄榄油浓度以及橄榄油补加时间, 结果由表 2 可知, 橄榄油对产酶有强烈诱导作用。橄榄油浓度为 0.3% 时, 最佳补加时间为第 24h; 橄榄油浓度提高至 0.5% 时, 最佳补加时间提前至第 8h。

表2 油脂诱导实验

浓度 (%)	加入时 间(h)	终pH	脂肪酶 (u/ml)	生物量
0.3	0	8.0	6.78	8.01
	8	8.0	6.87	7.45
	16	8.5	7.16	7.30
0.5	24	8.0	7.33	7.62
	0	8.0	6.17	8.50
	8	8.0	6.31	8.60
0.5	16	7.5	4.54	8.42
	24	7.5	2.76	8.20

2.3 诱导阻遏实验

以上实验表明橄榄油、油酸对产酶有诱导作用, 葡萄糖和甘油对产酶有阻遏作用。为排除细菌生长对脂肪酶形成的影响, 选用水洗细胞做诱导阻遏实验。

接入待试菌种至肉汁培养基, 摇床培养 16h 后取出离心, 倾去上清液, 加入无菌水洗涤, 再次离心, 取所得菌体与无菌水混匀, 每 250ml 三角瓶分装 30ml 菌悬液(其中含 24mg 干菌体), 分别加入橄榄油、油酸、葡萄糖和甘油进行培养, 不同培养时间取样测酶活, 结果见图 1。图 1 显示葡萄糖、甘油对产酶确有阻遏作用, 而橄榄油与油酸则有诱导作用。

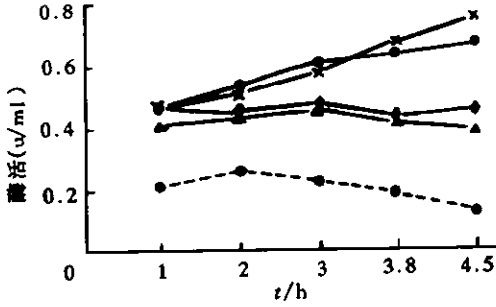


图1 水洗细胞胞外脂肪酶的诱导和阻遏形成

-x-0.5% 橄榄油 -●-0.5% 油酸
-◆-CK -▲-0.5% 甘油 -○-0.5% 葡萄糖

为了确定葡萄糖对1504菌株脂肪酶的分解代谢阻遏发生在转录水平还是在转译水平,分别添加葡萄糖、氯霉素和利福霉素,观察比较对脂肪酶形成的影响。为此目的,将橄榄油(0.5% v/v)添加至水洗细胞菌悬液中(制备方法同上),诱导脂肪酶的形成。保温培养1h后,分别添加葡萄糖(0.5%)、氯霉素(200μg/ml)和利福霉素(100μg/ml)。图2表明添加葡萄糖后脂肪酶的形成过程同添加利福霉素的效果一致,充分说明1504菌株脂肪酶分解代谢阻遏受转录控制调节。

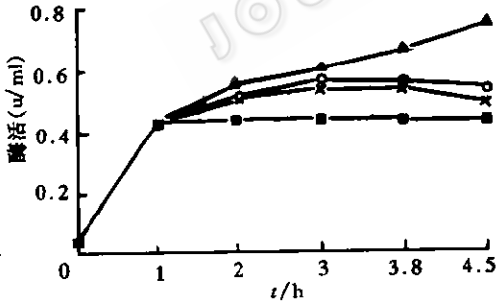


图2 葡萄糖、利福霉素和氯霉素对受橄榄油诱导的水洗细胞胞外脂肪酶的影响

-△-CK -x-葡萄糖
-○-利福霉素 -■-氯霉素

菌株的胞外脂肪酶形成受橄榄油和油酸的诱导,受葡萄糖分解代谢物阻遏,受甘油反馈阻遏。当橄榄油浓度较低时,橄榄油的综合作用效果为诱导作用;当橄榄油的浓度较高时,由于橄榄油的分解产物甘油浓度较高,甘油作为易利用的碳源反馈阻遏脂肪酶的合成。因而将橄榄油作为诱导物,需要考虑橄榄油的浓度和补加时间,以达到最佳诱导效果。而橄榄油的另一产物油酸诱导作用强烈,无反馈阻遏脂肪酶合成的现象。比较橄榄油和油酸的作用机制,我们认为油酸较橄榄油更适合于作为1504菌株胞外脂肪酶的诱导物。另外发现,葡萄糖是1504菌株的有效碳源,但葡萄糖作为易分解的碳源,当发酵液葡萄糖浓度高时,起到分解代谢物阻遏脂肪酶生成的效果。因此必须控制葡萄糖的浓度,以达到最大生物量和最大产酶量的效果。

综上所述,橄榄油和油酸的诱导,葡萄糖的分解代谢物阻遏,甘油的产物反馈阻遏等是菌株1504细胞自身经济有效合成脂肪酶的调节结果。调节机制的研究在理论上可增加对脂肪酶合成调控机制的认识,在应用上对提高产酶能力具有指导意义。

参 考 文 献

[1] Rapp P. *Enzyme Microb Technol*, 1995, 17:832~838.
 [2] Winkler U K, Stuckmann M J *Bacteriol*, 1979, 138: 663~670.
 [3] Tsujisaka Y, Iwai M, Fukumoto J, Okamoto Y. *Agri Biol Chem*, 1973, 37:837~842.
 [4] 谢舜珍, 吴琼发, 徐家立. *微生物学报*, 1986, 26(3): 260~264.
 [5] Gilbert E J, Droad J W., Jones C W. *Gen. Microb*, 1991, 137:2215~2221.
 [6] Espinosa E, Sanchez S, Farres A. *Biotechnol Lett*, 1990, 12:209~214.
 [7] Okeko C N, Okolo B N. *Biotechnol Lett*, 1990, 12: 747~750.

3 讨论

通过以上的研究,可初步得出结论:1504

REGULATION OF LIPASE SYNTHESIS BY *MICROCOCCLUS* SP. 1504

Chen Shouwen Xu Rou Zhang Kechang

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

Zeng Xiaobo

(Department of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract The regulation of extracellular lipase synthesis from *Micrococcus* sp.1504 was studied. Addition of long chain fatty acid and acyl esters to growing shake-flask cultures, enhanced the level of lipase activity produced, but the effect of middle or short chain fatty acid and acyl esters was opposite. High content of glucose inhibited the lipase production, olive oil enhanced the lipase production. The content of olive oil by added was changed, the optimum time when olive oil was added should changed. Synthesis of lipase activity by washed cells was induced by olive oil and oleic acid, repressed by glucose and glycerol. It is suggested that catabolite repression of lipase formation in *Micrococcus* sp. 1504 was mainly regulated by transcriptional control.

Key words Lipase, Induction, Repression, *Micrococcus* sp.1504