

磷脂酶产生菌株的筛选·鉴定和培养条件优化

朱丹峰, 胡雪芹, 张洪斌* (合肥工业大学生物与医学工程学院, 安徽合肥 230009)

摘要 [目的]筛选具有磷脂酶活性的菌株。[方法]采用磷脂平板初筛和摇瓶复筛筛选菌株,采用单因素试验研究菌株发酵产酶的最佳条件。[结果]最佳发酵配方和培养条件:复合碳源麦芽糖与大豆卵磷脂比例为3:1(1.5%:0.5%),最佳氮源为酵母粉1.0%,无机盐组成为 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.10%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.06%, CaCl_2 0.05%,发酵温度30℃,发酵时间4 d,比初筛时提高1.61倍。菌株所产磷脂酶是低温酶,其最适作用温度是30℃,最适作用pH为7.5。[结论]该研究为菌株产酶及酶的进一步研究提供参考。

关键词 磷脂酶;菌株筛选;鉴定;产酶优化

中图分类号 S-3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)19-0009-04

Screen and Identification of Phospholipase-producing Strain and Optimization of Its Culture Conditions

ZHU Dan-feng, HU Xue-qin, ZHANG Hong-bin (School of Biological and Medical Engineering, Hefei University of Technology, Hefei Anhui 230009)

Abstract [Objective] To screen a strain of phospholipase-activity. [Method] Strains were screened by phospholipid plate screening and shake flask screening, and single factor experiments were carried out to study the effect on the enzyme production by the strain. [Result] Best fermentation condition; the best compound carbon sources was the ratio of maltose and lecithin of 3:1, the best nitrogen source was yeast powder of 1.0%, the best salt combination was $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.10%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.06%, CaCl_2 0.05%, its optimum enzyme-producing temperature and time are 30℃ and 4 day respectively, which was 1.61 times higher than preliminary screen. It could not tolerate high temperature, its optimum reaction temperature and pH are 30℃ and 7.5, respectively. [Conclusion] The results can be regarded as the reference for further research on fermentation and enzymatic application.

Key words Phospholipase; Strains screen; Identification; Fermentation optimization

磷脂酶是用于磷脂改性专一性较强的酶,能够催化磷脂的各种水解反应,并在一定酰基的受体和供体存在下催化酯交换反应,对磷脂的结构进行各种改变或修饰,从而得到不同结构和用途的磷脂^[1]。磷脂酶是脂肪酶的一种,是界面酶,能在脂质-水界面催化水解磷脂,磷脂分散在水中,形成双层胶束,胶束与水的界面就是酶反应的点,反应界面的大小直接反映反应速度与水解程度^[2-5]。磷脂酶能应用于植物油的脱胶,即在炼油过程中(油脱胶)磷脂的去除^[6-7],相比传统方法,酶法脱胶是一种经济节约、高效稳定、绿色环保的脱胶方法。此外,其在焙烤食品工业、乳制品加工业、蛋黄酱加工业等领域具有重要用途^[8]。微生物种类繁多,生长周期短,易于分离和诱变,可工业化大规模培养,利用微生物发酵是工业化生产磷脂酶的良好途径。因此,获得高酶活的磷脂酶产生菌具有广阔的应用前景。笔者从土样中筛选磷脂酶产生菌株并对其特性进行研究,以为为磷脂酶的生产提供优良菌株。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 土壤样品。合肥地区油脂类物质污染后的表层土壤。

1.1.2 培养基。孟加拉红培养基(W/V)(分离真菌;加入放线菌酮以抑制真菌生长):孟加拉红培养基粉末3.5%,pH 7.2±0.2。真菌分离培养基(W/V):大豆卵磷脂3.0%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2%, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, CaCl_2 0.10%,琼脂2.0%,溴甲酚

紫0.003%,pH 7.2±0.2。真菌发酵培养基(W/V):大豆卵磷脂3.0%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2%, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, CaCl_2 0.10%,pH 7.2±0.2。灭菌条件:121℃灭菌20 min。

1.2 产磷脂酶菌株的筛选

1.2.1 平板初筛。将采集的土样按照10倍稀释法稀释,使用分离平板培养基进行菌株筛选。利用涂布法进行涂布,30℃恒温培养,菌落周围产生透明圈者为磷脂酶产生菌。透明圈直径和菌株直径比越大则表明磷脂酶的活力越大。将有透明圈的菌株用划线分离法进行分离纯化,并选择纯种的菌株进行下一步复筛。

1.2.2 摇瓶复筛。将平板初筛获得的菌株进行摇瓶培养,按照酶活力测定方法测定磷脂酶的活性,比较酶活力的大小,最终获得产酶能力最高的菌株,并斜面保存。

1.3 菌株鉴定

1.3.1 形态鉴定。观察菌株在分离培养基上的菌落形态、颜色等;参照《真菌鉴定手册》确定菌种。

1.3.2 分子生物学鉴定。利用真菌基因组DNA提取试剂盒提取菌株的基因组DNA,并以此为模板采用18S rDNA基因的通用引物NS6(5'-GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC-3')和NS1(5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3')进行PCR扩增。反应条件:94℃ 4 min;94℃ 45 s,55℃ 45 s,72℃ 1 min,30个循环;72℃ 10 min^[9-10]。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测鉴定后,交由上海生工生物工程股份有限公司测序。测序结果经GenBank上利用BLAST程序进行相似性搜索,选取相似性最高且有效发表的典型菌株的序列,用ClustalX 1.83进行序列比对,运用MEGA 4.0的Neighbor-Joining方法构建系统发育树。

1.4 磷脂酶活力的测定^[11-12] 将一定量经丙酮提纯的大豆

作者简介 朱丹峰(1992—),男,浙江湖州人,硕士研究生,研究方向:生物制药与酶工程。*通讯作者,教授,博士,从事生物制药与酶工程研究。

收稿日期 2018-02-23;修回日期 2018-03-05

卵磷脂溶于预订 pH 缓冲液中,10 000 r/min 均质 10 min,得到底物溶液。取 100 mL 三角瓶加 20 mL 底物溶液,于预订温度的水浴中预热 5 min,然后在各瓶中加入一定量的酶液,同时做空白样品,混匀计时,在预订温度的水浴中 180 r/min 振荡准确反应一定时间,于样品中和空白瓶中立即补加 95% 乙醇 10 mL 终止反应,取出,在自动滴定仪下用 NaOH 标准溶液滴定,计算标准碱液平均消耗量。

在特定条件下,1 min 水解磷脂产生 1 μmol 游离脂肪酸所需的酶量即为 1 个磷脂酶活力单位 $U^{[13]}$ 。

$$X = (V - V_0) \times C \times 100 / (0.1 \times t \times m)$$

式中, X 为样品酶活力, U/mL ; V 为样品消耗碱液的体积, mL ; V_0 为空白消耗碱液的体积, mL ; C 为 NaOH 溶液的浓度, mol/L ; t 为反应时间, min ; m 为酶液用量, mL 。

1.5 发酵条件优化

1.5.1 不同碳源、复合碳源比例对菌株 B8 产磷脂酶的影响。在基础发酵培养基其余组分和培养条件保持不变的情况下,以 2% 的比例,分别添加甘油、环糊精、蔗糖、乳糖、麦芽糖、葡萄糖、卵磷脂作为发酵产酶的碳源;根据碳源结果,卵磷脂是诱导物,考察碳源比例(麦芽糖和卵磷脂的比例为 5:1,4:1,3:1,2:1,1:1)对 B8 产酶的影响。

1.5.2 氮源对菌株 B8 产磷脂酶的影响。以 1.0% 的比例,分别添加蛋白胨、牛肉膏、酵母膏、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、 NH_4Cl 作为发酵的氮源,考察其对产酶的影响。

1.5.3 无机盐对 B8 菌株产磷脂酶的影响。选择 4 种无机盐: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0.04%、0.05%、0.06%)、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0.05%、0.10%、0.15%)、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.04%、0.05%、0.06%)、 CaCl_2 (0.05%、0.10%、0.15%),4 种无机盐设 3 个水平,以磷脂酶活力为指标,选择 $L_9(3^4)$ 进行正交试验^[14]。

1.6 培养条件优化

1.6.1 转速对菌株 B8 产磷脂酶的影响。在其他培养条件一致的情况下,将培养基在 160、180、200、220、240 r/min 条件下摇床培养 24 h 后,检测磷脂酶活力,确定摇床转速。

1.6.2 发酵时间对菌株 B8 产磷脂酶的影响。在其他培养条件一致的情况下,摇床振荡培养 24、48、72、96、120 h 后检测磷脂酶活力,确定最适发酵时间。

1.7 磷脂酶特性研究

1.7.1 反应温度对磷脂酶活力的影响。按照上述测定酶活的方法,将酶活力测定温度分别设置为 25、30、35、40、45、50、55 $^{\circ}\text{C}$,测定其酶活力,以确定磷脂酶的最适反应温度。

1.7.2 pH 对磷脂酶活力的影响。将酶活力测定初试 pH 分别设定为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0,测定酶活力,以确定磷脂酶的最适 pH。

2 结果与分析

2.1 产磷脂酶菌株的分离以卵磷脂为诱导物和底物,以溴甲酚紫为显色剂对土壤样本进行分离,可以形成白色透明圈,此法能粗略分离产磷脂酶的菌株。将初筛得到的菌株发酵提取酶液,细菌发酵温度 37 $^{\circ}\text{C}$,摇床转速 250 r/min,发酵 2~3 d,放线菌和真菌发酵温度 30 $^{\circ}\text{C}$,摇床转速 200 r/min,发

酵 3~5 d。每天观察发酵液的状态,发酵到一定程度后取出发酵液,8 000 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min,取上清液即酶液,在新体系中催化卵磷脂生成 GPC 量作为评价标准。利用薄层色谱检测产 GPC 的能力进行初步定性分析,初筛得到的 6 株较优菌株摇瓶发酵测定酶活,发现菌株 B8 活力最高,为 2.06 U/mL ,进一步对该菌株进行鉴定和产酶条件优化。菌株 B8 转化产物 TLC 检测结果见图 1。

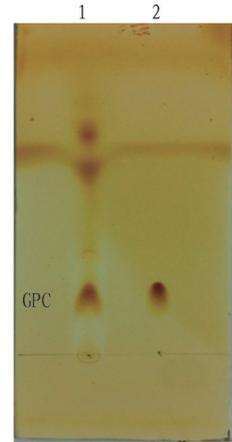


图 1 菌株 B8 转化产物 TLC 检测

Fig. 1 TLC test of transformation products from strain B8

2.2 菌株 B8 的鉴定

2.2.1 菌落形态鉴定。B8 菌株在分离培养基能产生明显的透明圈,菌落表面粗糙、蓬松,呈黑褐色,下层黏附在培养基上。

2.2.2 菌株分子生物学鉴定。将菌株 B8 的 18S rDNA 进行 PCR 扩增,测序得到一条 1 281 bp 左右的条带,利用 BLAST 程序与 GenBank 中已登录的基因序列进行比对,选取同源性高且已定名菌株的相关序列信息,用 ClustalX 1.83 进行序列比对,用 MEGA 4.1 的 Neighbor-Joining 法构建系统发育树。结合菌落形态及 18S rDNA 基因序列的比对结果,鉴定菌株 B8 为黑曲霉(图 2)。

2.3 发酵条件优化

2.3.1 碳源对 B8 菌株产磷脂酶的影响。菌株 B8 以选定的 7 种碳源进行发酵试验,其中麦芽糖的发酵液酶活力最高,达 2.21 U/mL ,其次是卵磷脂、葡萄糖、乳糖、蔗糖及甘油,环糊精产酶效果最差(图 3)。考虑到卵磷脂对酶有一定的诱导作用,继续考察复合碳源(麦芽糖和卵磷脂的比例为 5:1,4:1,3:1,2:1,1:1)对 B8 产酶的影响,结果显示复合碳源较单一碳源有所提高,但各试验组差别不大,其中麦芽糖和卵磷脂比例 3:1 磷脂酶活力最高(图 4)。

2.3.2 氮源对 B8 菌株产磷脂酶的影响。氮源能构成微生物细胞和含氮的代谢产物,选择合适的氮源对获得高产量的磷脂酶有重要影响^[15]。结果显示,B8 对有机氮源的利用效果较好,其中以麦芽糖作为氮源时,磷脂酶活力最高,达 2.54 U/mL (图 5)。

2.3.3 无机盐的正交试验。对 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (A)、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (B)、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (C)、 CaCl_2 (D) 进行正交设计试验,进一

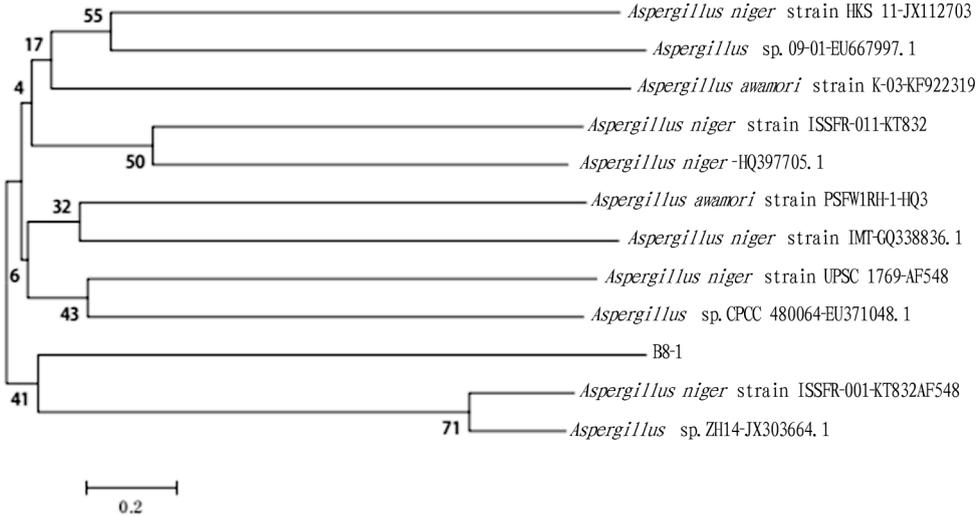


图 2 基于 18S rDNA 序列的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on 18S rDNA sequences similarity of selected strains

步确定无机盐的最佳配比,结果见表 1。由表 1 可知,各因素的影响由大到小依次为 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、 CaCl_2 。 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 是影响发酵产酶结果的最重要因素。最优无机盐的组成为 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.10%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.06%、 CaCl_2 0.05%。

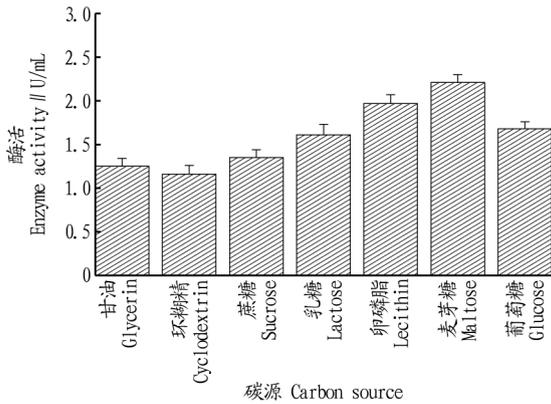


图 3 碳源对 B8 产磷脂酶的影响

Fig. 3 Effect of carbon sources on phospholipase activity of submerged cultured B8

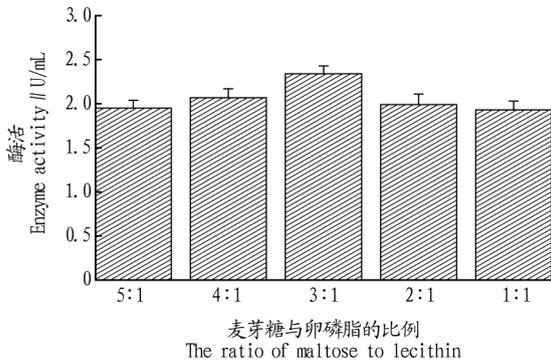


图 4 复合碳源比例对 B8 产磷脂酶的影响

Fig. 4 Effect of compound carbon sources on phospholipase activity of submerged cultured B8

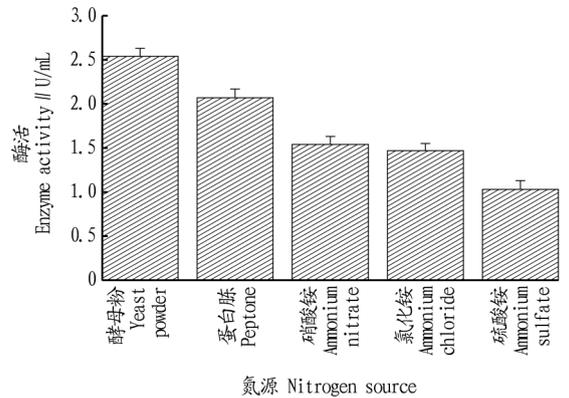


图 5 氮源对 B8 产磷脂酶的影响

Fig. 5 Effect of nitrogen sources on phospholipase activity of submerged cultured B8

过单因素试验对培养条件进行优化。由图 6 可知,提高转速可以提高发酵体系的溶氧浓度,对磷脂酶的合成非常有利,

表 1 无机盐对 B8 产磷脂酶的正交试验结果

Table. 1 Quadrature analysis of inorganic salt on phospholipase activity of submerged cultured B8

试验号 No.	因素 Factor				酶活 Enzyme activity//U/mL
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	2.350
2	1	2	2	2	2.440
3	1	3	3	3	2.610
4	2	1	2	3	2.790
5	2	2	3	1	3.140
6	2	3	1	2	2.830
7	3	1	3	2	2.590
8	3	2	1	3	2.480
9	3	3	2	1	2.420
k_1	2.467	2.577	2.553	2.637	
k_2	2.920	2.687	2.550	2.620	
k_3	2.497	2.620	2.780	2.627	
R	0.453	0.110	0.230	0.017	

2.4 培养条件优化 在确定发酵培养基配方的基础上,通

转速 220 r/min 时酶活性最高。培养 3~4 d 时酶活力相对较高(图 7),继续培养营养条件恶化,菌体生长停滞甚至自溶,酶活降低。

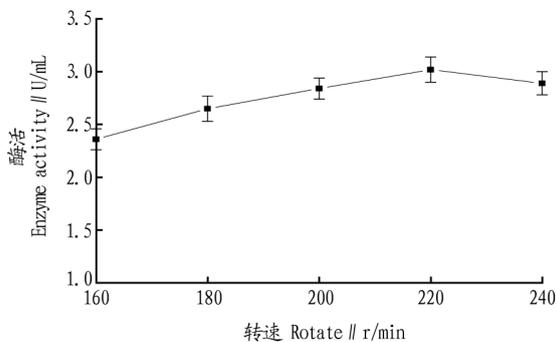


图 6 转速对 B8 产磷脂酶的影响

Fig. 6 Effect of nitrogen rotate on phospholipase activity of submerged cultured B8

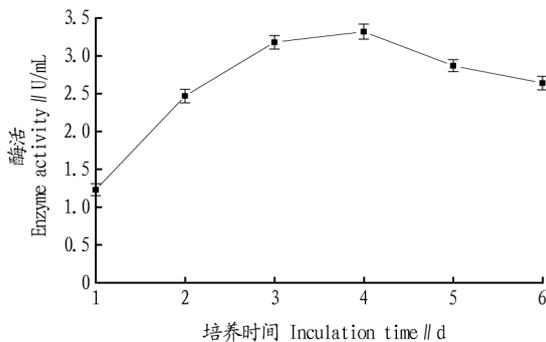


图 7 培养时间对 B8 产磷脂酶的影响

Fig. 7 Effect of incubation time on phospholipase activity of submerged cultured B8

2.5 磷脂酶特性

2.5.1 反应温度对磷脂酶活性的影响。由图 8 可知,发酵液的磷脂酶活约在 30 ℃ 时达到最大,超过 30 ℃ 后,酶活下降。这说明发酵得到的是一种低温磷脂酶。

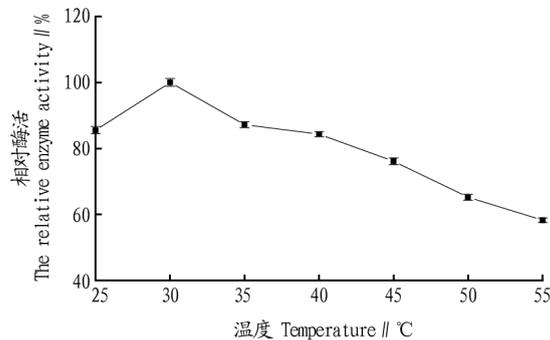


图 8 温度对磷脂酶活性的影响

Fig. 8 Effect of temperature on phospholipase enzyme activity

2.5.2 pH 对磷脂酶活性的影响。由图 9 可知,发酵液的磷脂酶活约在 pH 7.5 时达到最大,pH 超过 8.0 后酶活显著下降。这说明发酵得到的磷脂酶最佳 pH 为 7.5。

3 结论

生物酶催化反应条件温和,具有严格的对应或区域选择性,在工业化学合成中应用十分广泛,有机化学品的制造逐

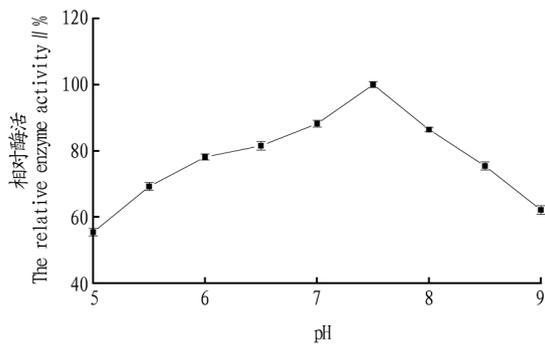


图 9 pH 对磷脂酶活性的影响

Fig. 9 Effect of pH on phospholipase enzyme activity

渐向生物法靠拢^[16]。该试验采用固体平板初筛和摇瓶复筛获得了磷脂酶高产菌株,初步鉴定其为黑曲霉,对该菌株培养条件优化,通过摇瓶发酵检测得出,复合碳源麦芽糖与大豆卵磷脂比例为 1.5% 与 0.5%,最佳氮源为酵母粉 1.0%,无机盐组成为 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.10%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.06%, CaCl_2 0.05%,发酵温度 30 ℃,发酵时间 4 d,较出发菌株酶活提高了 1.61 倍。菌株所产磷脂酶是低温酶,其最适作用温度为 30 ℃,最适作用 pH 为 7.5。

该菌种为野生菌,经多次传代后基本不变,适合作为出发菌株进行后续研究,如诱变、基因重组和纯化等,从而更好地用于磷脂改性 with 植物油脱胶。

参考文献

- [1] 郭浩. 磷脂酶 D 高产菌株的选育及发酵条件优化[D]. 西安:西北大学,2007.
- [2] KHAN F I, NIZAMI B, ANWER R, et al. Structure prediction and functional analyses of a thermostable lipase obtained from *Sheuanelle putrefaciens* [J]. Journal of biomolecular structure & dynamics, 2017, 35 (10): 2123-2135.
- [3] ARAVINDAN R, ANBUMATHI P, VIRUTHAGIRI T. Lipase applications in food industry [J]. Indian journal of biotechnology, 2007, 6(2): 141-158.
- [4] ALOULOU A, RODRIGUEZ J A, FERNANDEZ S, et al. Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies [J]. Biochimica et biophysica acta, 2006, 1761(9): 995-1013.
- [5] 王大海, 于才渊, 杨天奎. 磷脂酶 A₁ 催化水解大豆浓缩磷脂的研究 [J]. 食品工业科技, 2008, 29(2): 233-235.
- [6] YU D Y, MA Y, JIANG L Z, et al. Optimization of magnetic immobilized phospholipase A₁ degumming process for soybean oil using response surface methodology [J]. European food research & technology, 2013, 237(5): 811-817.
- [7] YU D Y, MA Y, XUE S J, et al. Characterization of immobilized phospholipase A₁ on magnetic nanoparticles for oil degumming application [J]. LWT-Food Science and Technology, 2013, 50(2): 519-525.
- [8] CASADO V, MARTIN D, TORRES C F, et al. Phospholipases in food industry: A review [J]. Methods in molecular biology, 2012, 861: 495-523.
- [9] 曹凤明, 杨小红, 马鸣超, 等. 枯草芽孢杆菌近缘种群鉴定方法研究进展 [J]. 微生物学通报, 2014, 41(5): 968-974.
- [10] 冯志彬, 张娟, 陈国忠, 等. 产 L-天冬氨酸 α-脱羧酶细菌的分离、鉴定及发酵条件优化 [J]. 微生物学报, 2016, 56(1): 44-55.
- [11] YANG J G, WANG Y H, YANG B, et al. Degumming of vegetable oil by a new microbial lipase [J]. Food technology & biotechnology, 2006, 44(1): 101-104.
- [12] 占剑峰. 磷脂酶 A₁ 的发酵制备、分离纯化及催化特性的研究 [D]. 合肥: 合肥工业大学, 2013.
- [13] 郭勇. 酶工程原理与技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2005.
- [14] 赵春海, 阙振荣. 无机盐及微量元素对乙酰乳酸脱羧酶发酵活力的影响 [J]. 中国酿造, 2005, 24(6): 26-29.
- [15] 沈萍, 陈向东. 微生物学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2007.
- [16] OGAWA J, SHIMIZU S. Microbial enzymes: New industrial applications from traditional screening methods [J]. Trends in biotechnology, 1999, 17(1): 13-20.