

制备生物柴油用脂肪酶产生菌的诱变和筛选



LI Xun

李 迅¹, 李治林¹, 杨 杨¹, 王 飞^{1*}, 蒋剑春²

(1. 南京林业大学化学工程学院, 江苏 南京 210037; 2. 中国林业科学研究院
林产化学工业研究所; 国家林业局林产化学工程重点开放性实验室, 江苏 南京 210042)

摘 要: 以提高全细胞生物催化制备生物柴油的效率为目的, 采用紫外诱变的方法对产脂肪酶的米根霉菌株进行诱变和筛选。筛选得到的诱变株命名为 LY6, 脂肪酶水解酶活(4.33 U/mL)是原始菌株的 4.33 倍, 合成酶活(0.28 U/mL)是原始菌株的 1.12 倍, 脂肪酶水解酶最适反应 pH 值为 7.0。

将筛选得到的菌株制备成固定化全细胞生物催化剂催化大豆油转酯化制备生物柴油, 在醇油比为 3:1 (物质的量之比, 下同) 时, 脂肪酸甲酯得率比原始菌株提高了 41.0%, 达到 87.3%; 在醇油比为 4:1 时, 最终生物柴油的甲酯得率比原始菌株提高了 16.8%, 达到 96.1%, 故经筛选得到的菌株能作为全细胞生物催化制备生物柴油的优良菌株。

关键词: 米根霉; 紫外诱变; 脂肪酶; 生物柴油

中图分类号: TQ91; Q85

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2007)06-0085-05

Inducing and Screening of Lipase-producing Strain for Biodiesel Fuel Production

LI Xun¹, LI Zhi-lin¹, YANG Yang¹, WANG Fei¹, JIANG Jian-chun²

(1. College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 2. Institute of Chemical Industry of Forest Products, CAF; Key and Open Lab. on Forest Chemical Engineering, SFA, Nanjing 210042, China)

Abstract: In order to improve the lipase activity of the *Rhizopus oryzae* strain which is used for producing biodiesel fuel, ultraviolet mutation is employed in this research. The hydrolytic lipase activity and synthetic lipase activity of the selected strain *R. oryzae* LY6 was 433% and 112% as much as that of the original strain, reaching to 4.33 and 0.28 U/mL respectively. The maximum hydrolytic lipase activity of *R. oryzae* LY6 was at pH value 7.0. The immobilized *R. oryzae* LY6 as whole cell catalyst was used to catalyze transesterification of soybean oil. When the ratio of methanol to soybean oil is 3:1, the content of methyl ester in biodiesel fuel was 87.3%, which is 41.0% higher than the original one. When the ratio of methanol to soybean oil is 4:1, the content of methyl ester was 96.1%, which is 16.8% higher than the original one.

Key words: *Rhizopus oryzae*; ultraviolet mutation; lipase; biodiesel fuel

生物柴油是指由动植物油脂与短链醇(甲醇或乙醇)进行酯交换反应生成的脂肪酸单酯, 是一种清洁可再生的生物能源。发展生物柴油产业有益于保护生态环境, 对我国国民经济可持续发展意义重大。在生物柴油的工业化生产中, 使用全细胞生物催化剂的方法将很有前途, 细胞中的脂肪酶不仅能催化底物天然油脂水解, 也能在非水相中催化酯合成、转酯化等反应^[1]。此方法具有提取简单、反应条件温和、醇用量小、甘油易回收和无废物产生等优点, 且此过程还能进一步合成其他一些高价值的产品, 包括可生物降解的润滑剂以及用于燃料和润滑剂的添加剂^[2]。而米根霉脂肪酶以其较好的立体选择性、较高的转化率和稳定性等优点, 是全细胞法生产生物柴油的最成功的菌种之一。目前为进一步提高全细胞生物催化剂的催化效率, 应加强产脂肪酶细胞的培养、预处理和应用基础研究^[3]。同时迄今尚未见有针对生物柴油生产用脂肪酶产生菌进行有目的的诱变育种的报道, 因此探索其诱变育种方法

收稿日期: 2007-09-20

基金项目: 国家 948 引进创新项目资助(2006-4-C05); 南京林业大学高学历人才基金资助项目(163030024)

作者简介: 李 迅(1975-), 女, 江苏无锡人, 讲师, 博士, 主要从事生物转化研究

* 通讯作者: 王 飞, 教授, 博士, 博士生导师, 研究领域: 天然产物化学、生物质能源与生物质化学品; E-mail: feiwang@njfu.com.cn。

对于早日实现全细胞生物催化制备生物柴油具有重要的现实意义。本研究采用紫外诱变的方法对米根霉菌株进行诱变,初筛以荧光圈法和胞外脂肪酶活测定为基准,复筛以催化合成生物柴油的能力为指标,筛选适用于生物柴油生产的脂肪酶产生菌。

1 材料与仪器

1.1 试剂和仪器

米根霉(*Rhizopus oryzae*),由本实验室筛选保存。制备生物柴油用原料为食用大豆油,上海福临门食品有限公司。甲醇、去氧胆酸钠(上海科丰化学试剂有限公司)、罗丹明 B(Sigma)等试剂均为分析纯。仪器:BECKMANX-22R 型高速离心机,美国;SHIMADZU GC-14B 气相色谱仪,日本;CHRIST ALPHA 1-2 LD 冷冻干燥机,德国;北京发思 D-1 高温灭菌锅;苏州安泰 VS-1300L-U 洁净工作台。

1.2 培养基

斜面 and 种子培养基:PDA 培养基^[4]。

发酵培养基(g/L):胰蛋白胨 20,大豆油 3,NaNO₃ 1,KH₂PO₄ 1,MgSO₄ 0.5,初始 pH 值 5.5。

基础培养基(g/L):NaNO₃ 3,酵母膏 0.2,K₂HPO₄ 1,KCl 0.5,MgSO₄·7 H₂O 0.5,FeSO₄·7 H₂O 0.5,pH 值自然。

筛选培养基(g/L):橄榄油 20,NaNO₃ 3,K₂HPO₄ 1,KCl 0.5,MgSO₄·7 H₂O 0.5,FeSO₄·7 H₂O 0.5,罗丹明 B 0.01,去氧胆酸钠 1,pH 值自然。

1.3 形成单菌落的试验

米根霉生命力强,生长旺盛,在培养基上交织成疏松的絮状菌落,其菌丝蔓延成网状,可蔓延覆盖整个平板表面,这使筛选工作无法进行。因此有必要通过菌液稀释和添加去氧胆酸钠^[5],使米根霉形成明显单菌落便于挑选。配制质量浓度分别为 0.5、0.8 和 1 g/L 的去氧胆酸钠的筛选平板培养基,将紫外诱变后菌液做适当的梯度稀释,分别从中取 0.1 mL 菌液涂布在筛选平板上,置于 28 °C 生化培养箱中培养,观察形成单菌落的情况,从而选出适当的菌液稀释浓度和去氧胆酸钠浓度。

1.4 脂肪酶活力测定方法

脂肪酶的水解酶活力测定:橄榄油乳化液法^[6]。聚乙烯醇橄榄油乳化液 4 mL 和 0.025 mol/L pH 值 7.5 磷酸缓冲液 5 mL,加入 1 mL 脂肪酶液,在 40 °C 反应 15 min。加入 95 % 乙醇 15 mL 终止反应,以 10 g/L 酚酞为指示剂,用 0.05 mol/L 标准 NaOH 滴定至微红为终点。同时以煮死失活的酶液作空白对照。在测定条件下,每分钟催化脂肪水解产生 1 μmol 脂肪酸的脂肪酶量定义为 1 个脂肪酶水解酶活力单位。

脂肪酶的合成酶活力测定:3 mL 合成酶活底物(1.35 % 正丁酸,2.7 % 正丁醇,85.95 % 正庚烷),加入 1 mL 脂肪酶液,在 40 °C 反应 2 h。加入 95 % 乙醇 15 mL 终止反应。以 10 g/L 酚酞为指示剂,用 0.1 mol/L 标准 NaOH 滴定至微红为终点。同时以煮死失活的酶液作空白对照。在测定条件下,每分钟催化正丁酸和正丁醇合成产生丁酸丁酯,从而减少 1 μmol 正丁酸的酶量定义为 1 个脂肪酶合成酶活力单位。

1.5 紫外诱变

用 25 mL 8.5 g/L 生理盐水将平板上的米根霉孢子洗下,转移至装有玻璃珠的三角瓶中,以 160 r/min 的转速振荡 30 min,用两层擦镜纸过滤到无菌空三角瓶中,制得孢子悬液。将放有转子的培养皿置于磁力搅拌器上,将 20 mL 孢子悬液加至培养皿内,放在距离紫外灯 30 cm 处,照射期间用磁力搅拌器对其适速搅拌,在紫外灯下分别垂直照射 2、3 和 4 min,照射后分别取 5 mL 于无菌三角瓶中,加入 5 mL 液体基本培养基,立即在暗处修复培养。将经暗处修复培养的菌液用两层擦镜纸过滤至无菌三角瓶中,用无菌水做适当稀释,取稀释后的菌液各 0.1 mL 涂布于筛选平板上,28 °C 培养 3~4 d。然后在 350 nm 紫外光下观察,产脂肪酶菌株能分解油脂生成脂肪酸,使罗丹明 B 由红色变成浅红色,形成橙黄色的荧光圈,依据产生荧光圈的先后和荧光圈直径与菌落直径比值的大小分离筛选出脂肪酶活性高

且产酶周期短的菌株,直径比值大的菌落表明水解脂肪酶的能力强^[7]。

1.6 筛选方法

选取荧光圈较大且菌落较小的菌株接种在 PDA 斜面培养基中保存。将筛选出的菌株接种在液体产酶培养基中培养 48 h,分别测定脂肪酶水解酶活和合成酶活,并且做平行实验,选取脂肪酶水解酶活和合成酶活都较高的菌株作为制备生物柴油复筛的出发菌种。通过比较催化大豆油脂交换形成脂肪酸甲酯的能力进行复筛。以聚氨酯泡沫固定米根霉细胞,冷冻干燥固定了米根霉细胞的聚氨酯泡沫,计算固定细胞的质量。将固定细胞的聚氨酯泡沫放入 28.95 g 大豆油和 1.05 g 甲醇中,每隔 12 h 加入 1.05 g 甲醇,共加 3 次甲醇,即甲醇和大豆油最终物质的量之比为 3:1,另加入 10% 的去离子水,35 °C 160 r/min 的摇床反应,进行酯交换反应制备生物柴油,筛选出甲酯得率最高的菌株。

1.7 产物脂肪酸甲酯得率的测定

采用气相色谱法分析,以十七烷酸甲酯作为内标,用岛津 GC-14B 气相色谱分析,分析条件为:PEG-20毛细管柱,FID 检测器,载气为高纯 N₂,进料量 0.1 μL,进样口温度 250 °C,检测器温度 260 °C,程序升温 120 ~ 250 °C,升温速度 5 °C/min,根据峰面积用内标法计算出甲酯得率。

1.8 诱变后菌株脂肪酶的最适反应温度和最适反应 pH 值确定

将筛选出的菌株接种在液体产酶培养基中培养 72 h 后,测定脂肪酶水解酶活。最适反应温度 25 ~ 50 °C 范围内测定脂肪酶水解酶活,以最高酶活数为 100% 计算相对酶活。最适反应 pH 值 5.5 ~ 8.5 范围内测定脂肪酶水解酶活,以最高酶活数为 100% 计算相对酶活。缓冲液为 50 mmol/L 磷酸缓冲液。

1.9 不同醇油比时诱变前后菌株催化转酯化效果

以聚氨酯泡沫分别固定诱变前后的米根霉细胞,经冷冻干燥后,将固定诱变前后米根霉细胞的聚氨酯泡沫分别放入 28.95 g 大豆油和 1.05 g 甲醇中,每隔 12 h 加入 1.05 g 甲醇,共加 n 次甲醇,即甲醇和大豆油最终物质的量之比为 n:1,其他条件同 1.6 节,进行酯交换反应制备生物柴油。脂肪酸甲酯的得率计算同 1.7 节。定义醇油比即为甲醇和大豆油物质的量之比,下同。

2 结果与分析

2.1 紫外诱变菌株单菌落形成的适当条件

通过预试验发现,当加入 1 g/L 去氧胆酸钠,紫外诱变照射时间分别为 0.5、1、3、5 和 8 min 时,其平板菌落致死率变化范围在 37.6% ~ 100.0%,而近年来发现在用紫外线作诱变剂时正变较多地出现在偏低的剂量中,从而倾向于采用较低的剂量(30% ~ 75% 致死率)。因此该实验选取紫外照射时间为 2、3 及 4 min 作为紫外诱变剂量。同时加上暗培养后经过过滤除去大部分野生型的方法,来减少每皿的存活菌落数。发现将紫外诱变后菌液做梯度稀释涂布培养,加入去氧胆酸钠的质量浓度为 0.8 g/L 以下无法使米根霉生成单菌落。而且菌液稀释度需大于 10⁻²时才能长出菌落。因此可以确定筛选平板中去氧胆酸钠的添加质量浓度为 1 g/L,紫外诱变后菌液稀释度为 10⁻²、10⁻¹和 10⁰时,使每皿存活 30 个以下菌落,有利于菌株的选育。

2.2 米根霉的筛选

本研究采用的筛选方法所得到的结果(利用胞外酶)与固定化后细胞(利用胞内酶)所表现的转化率提高之间存在必然联系,因为通过对米根霉脂肪酶胞外和胞内酶活的测定,发现米根霉脂肪酶胞外和胞内酶活在一定程度上有相关性,即在本实验条件下米根霉脂肪酶胞外酶活和胞内酶活成正比。而米根霉脂肪酶胞外酶的测定方法相对简便,灵敏度更高,因此初筛采用测定胞外酶酶活的方法。

通过对初始菌株进行紫外诱变和罗丹明 B 平板筛选得到 7 株诱变菌株,再对这 7 株菌分别测定水解酶活和合成酶活,结果如表 1 所示。通过比较表 1 的测定结果,可看出紫外诱变后的菌株 1 和 6 的脂肪酶水解酶活与诱变前菌株比较有明显提高,而菌株 3 的脂肪酶合成酶活较诱变前提高了 100% 以上。故选定菌株 1、菌株 3 和菌株 6 为复筛的出发菌株,与未诱变菌株在催化制备生物柴油的能力进行对比。

表1 紫外诱变对米根霉菌株酶活的影响

酶活 activities	原始菌株 raw <i>R. oryzae</i> strain	诱变菌株 <i>R. oryzae</i> strains after mutation						
		1	2	3	4	5	6	7
水解酶活 hydrolytic lipase activity	1.00	2.33	1.67	1.50	2.00	1.33	4.33	0.67
合成酶活 synthetic lipase activity	0.25	0.25	0.21	0.58	0.08	0.17	0.28	0.08

本研究以正庚烷为溶剂稀释经米根霉菌细胞催化转酯化得到的产品油,加入1:1的十七烷酸甲酯作为内标物,此混合溶液作为气相色谱分析进样溶液,分析计算脂肪酸甲酯的得率,原始菌株、菌株1和菌株3的甲酯得率分别为62.76%、72.68%和62.42%,而菌株6催化合成生物柴油甲酯得率达到87.29%,通过计算发现菌株6催化合成生物柴油的甲酯得率比原始菌株催化反应提高了24.53个百分点。再由表1可看出,菌株6的水解酶活和合成酶活都较理想,相应水解酶活是原始菌株的4.33倍,合成酶活是原始菌株的1.12倍,酶活分别达到4.33和0.28 U/mL,因此选择菌株6作为最终筛选菌株,命名为*R. oryzae* LY6。由于产酶菌株性质的不同,酶活测定方法采用底物的不同,酶的发酵活力有很大差别。无位置专一性酶如假丝酵母脂肪酶,发酵活力可达8000 U/mL^[8]。而Ban等^[9]用于全细胞生物催化生产生物柴油的固定化米根霉获得1.62 U/mL的酶活力,最终甲酯化得率最高达到90%。尽管米根霉脂肪酶发酵水平偏低,但聚氨酯泡沫固定的米根霉全细胞胞内脂肪酶能和胞外脂肪酶发挥相当的作用,且在含水的全细胞催化系统中甲酯化得率最高,达到90%^[9]。以上可以看出菌株LY6脂肪酶酶活在米根霉菌株中属于上游水平,可有效应用于生物柴油的制备,因此提高其发酵水平有重要意义。

2.3 诱变前后菌株脂肪酶的最适反应温度和最适反应 pH 值比较

由图1和图2看出,诱变后的*R. oryzae* LY6菌株脂肪酶的最适反应温度没有变化,仍然为35℃;但最适pH值发生了偏移,诱变后的菌株脂肪酶的最适反应pH值变为7.0,中性的条件更适合催化转酯化制备生物柴油的中性反应环境,这可能也是*R. oryzae* LY6菌株获得较好甲酯得率的原因之一。

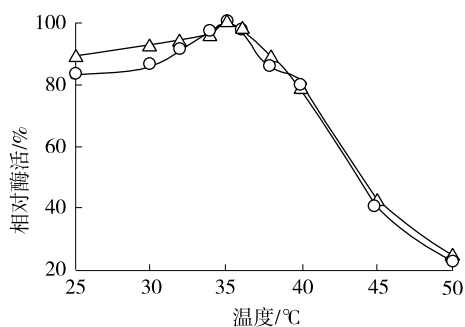


图1 温度对菌株脂肪酶酶活的影响

Fig. 1 Effects of temperature on enzyme activity

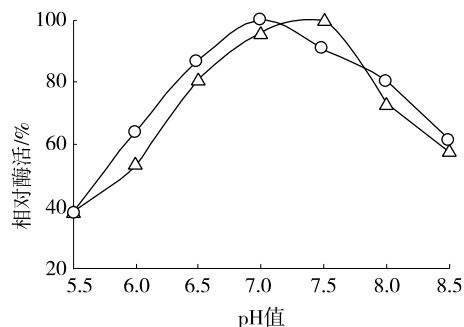


图2 pH值对菌株脂肪酶酶活的影响

Fig. 2 Effects of pH value on enzyme activity

2.4 不同醇油比时诱变前后菌株催化转酯化效果

实验考察了不同醇油比(物质的量之比,下同)时诱变前后菌株催化大豆油转酯化反应脂肪酸甲酯的得率,并重复了3次,取平均值后结果如表2所示。由表2看出,在不同的醇油比条件下,*R. oryzae* LY6都要比诱变前菌株性能优越,产物的甲酯得率都有相应提高,特别在醇油比为3:1时,产品的甲酯得率比原始菌株提高了41.0%,达到87.3%;在醇油比为4:1时,产物的甲酯得率比原始菌株提高了16.8%,达到96.1%。同时可看出诱变后筛选得到的*R. oryzae* LY6菌株能显著缩短转酯化反应时间和节省原料,第4次加入甲醇后甲酯得率便可达到95%以上。若进一步优化固定化条件和反应条件,*R. oryzae* LY6菌株能作为生产生物柴油的优质菌株材料。

表2 不同醇油比时诱变前后菌株催化性能比较

Table 2 Catalytic activity of *R. oryzae* strains before and after mutation under different molar ratios of methanol to soybean oil

$n(\text{醇}):n(\text{油})$ $n(\text{methanol}):n(\text{soybean oil})$	原始菌株甲酯得率/% yield of methyl ester of original strain	诱变菌株甲酯得率/% yield of methyl ester of mutated strains	增长率/% increase rate
1:1	32.8	45.6	39.0
2:1	51.9	70.3	35.5
3:1	61.9	87.3	41.0
4:1	82.3	96.1	16.8
5:1	96.6	97.2	0.6
6:1	97.2	98.7	1.5
7:1	98.1	98	-0.1
8:1	96.1	98.5	2.5

2.5 突变株的遗传稳定性试验

脂肪酶高产突变株 LY6 繁殖转移 5 代后,再发酵测其酶活,发现脂肪酶活力变化不大,且从外观观察孢子布满整个斜面的时间、孢子大小、颜色、密度也基本无变化。可以得出结论:菌株 LY6 具有较高遗传稳定性,可以作为生产菌株进行应用。

3 结论

3.1 选用紫外照射时间为 2、3 及 4 min,加上暗培养后经过菌丝过滤除去大部分野生型的方法,紫外诱变后涂布的米根霉菌液稀释度为 $10^{-2} \sim 10^0$,去氧胆酸钠的质量浓度为 1 g/L,使每皿存活单菌落数利于菌株的选育。

3.2 采用紫外诱变的方法对米根霉菌株进行诱变,以荧光圈法和脂肪酶酶活测定为初筛,用聚氨酯泡沫固定化米根霉细胞,在甲醇和大豆油最终物质的量之比为 3:1 的反应体系中,催化合成生物柴油的能力作为复筛,筛选适用于生物柴油生产的脂肪酶高产米根霉菌株。筛选得到的诱变菌株 *R. oryzae* LY6,水解酶活是原始菌株的 4.33 倍,合成酶活为原始菌株的 1.12 倍,酶活分别达到 4.33 和 0.28 U/mL,诱变后的菌株脂肪酶的最适反应 pH 值发生偏移,变为 7.0,即中性条件。

3.3 筛选得到的诱变菌株 *R. oryzae* LY6 在醇油比为 3:1 时,大豆油转酯化反应中甲酯得率比原始菌株提高了 41.0%,达到 87.3%;在醇油比为 4:1 时,甲酯得率比原始菌株提高了 16.8%,达到 96.1%。经紫外诱变后筛选得到的 *R. oryzae* LY6 菌株和原始菌株相比,性能优越,能缩短反应时间,节省原料甲醇,提高甲酯得率。

参考文献:

- [1] JAEGER K E, EGGERT T. Lipase for biotechnology[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, 13: 390-397.
- [2] YASUHISA A, HIDEKI F, YUJI S, et al. Biofuel production process by novel biocatalysts [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2002, 17(3): 111-123.
- [3] 杨继国,林炜铁,吴军林. 酶法合成生物柴油的研究进展[J]. *化工环保*, 2004, 24(2): 37-42.
- [4] 无锡轻工大学. 微生物学[M]. 北京:中国轻工业出版社,1990:597.
- [5] 吴雪梅. 小曲中霉菌的分离纯化鉴定[J]. *酿酒科技*, 2004, 126(6): 33-36.
- [6] WANABE N, OTA Y, MINOAO Y, et al. Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms cultural conditions and properties of crude enzymes[J]. *Agric Biol Chem*, 1977, 41: 1353-1358.
- [7] KOUKER G, JAEGER K E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases[J]. *Appl Envir Microbial*, 1987, 53: 211-213.
- [8] TAN Tian-wei, ZHANG Mu, WANG Bing-wu. Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation[J]. *Process Biochem*, 2003, 39(4): 459-465.
- [9] BAN K, KAIEDA M, MATSUMOTO T, et al. Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2001(8): 39-43.