

# 碱性脂肪酶产生菌的筛选及产酶条件的优化

牛冬云 张义正

(四川大学生命科学学院四川省分子生物学及生物技术重点实验室,成都,610064)

**摘 要** 通过固体平板法从含油脂土样中筛选出一株产碱性脂肪酶活力较高的菌株,鉴定为解淀粉芽孢杆菌。此菌最佳产酶条件为:1%淀粉为碳源,2%黄豆粉和2%玉米粉为氮源,培养基起始pH 7.0,30℃培养72h。对发酵液性质进行初步研究发现,此酶最适反应温度为37℃,最佳反应pH为8.5。0.01 mol/L  $\text{Ca}^{2+}$ 和 $\text{K}^{+}$ 对酶有激活作用,而 $\text{Cu}^{2+}$ 和 $\text{Fe}^{3+}$ 则对该酶有抑制作用。

**关键词** 解淀粉芽孢杆菌,固体平板法,碱性脂肪酶,发酵条件,酶性质分析

脂肪酶(E3.1.1.3)是一种特殊的酯键水解酶,它不需要辅酶即可催化油水界面的甘油三酯水解生成甘油及长链脂肪酸。脂肪酶广泛存在于许多动植物及微生物中<sup>[1~3]</sup>,主要应用于食品加工及食品风味改革、油脂水解、皮革绢纺原料脱脂、废水处理、洗涤工业等方面。作为一种高效无污染的脱脂剂,脂肪酶在皮革脱脂工艺上尤其具有重要的用途,它可以把难溶于水、不易皂化的脂肪分解为易溶于水的甘油和脂肪酸,且在碱性条件下使得脂肪更易从皮中除去。与传统的皂化法、乳化法和溶剂法脱脂相比较,酶法脱脂皮板柔软、富有弹性、粒面毛孔清晰、毛发光亮柔软,对皮革质量有明显的提高<sup>[4]</sup>。由于微生物资源丰富,生产不受自然环境的影响,可用人工控制来大量生产目的酶,产酶周期短,生产成本低,是一种经济而实用的方法。

我国对微生物脂肪酶的研究与开发较晚,有关细菌碱性脂肪酶的研究报道较少<sup>[5]</sup>,与国外脂肪酶的研究与应用存在一定的差距。本文报道了产碱性脂肪酶菌株的分离、鉴定及产酶条件优化等方面的研究结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 土样来源

来自于成都附近地区的含脂肪多的土样、油样。

#### 1.1.2 培养基

肉汁胨斜面培养基(%):蛋白胨1.0,牛肉膏0.3,NaCl 0.5,琼脂1.5。

液体培养基:勿需添加琼脂。

初筛上层培养基(%):牛肉膏0.3,蛋白胨1.0,NaCl 0.5,琼脂1.5,pH 8.5。

初筛下层培养基(%):三丁酸甘油酯0.5,琼脂1.5,pH 8.5。取上下层各10mL倒平板做为初筛培养基。

摇瓶培养基(%):豆饼粉2.0,玉米粉2.0,可溶性淀粉1.0, $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5, $\text{NaNO}_3$  0.5,pH 8.5。

## 1.2 方 法

### 1.2.1 平板筛选方法

将土样用无菌水适当稀释,取一定量涂布于初筛培养基,37℃培养,产脂肪酶的菌株会分解底物三丁酸甘油酯产生透明圈,依据产生透明圈的早晚和透明圈直径与菌落直径比值的大小分离出脂肪酶活性高且产酶周期短的菌株,挑至肉汁胨斜面上保存。

### 1.2.2 复筛及发酵方法

挑取肉汁胨斜面上的菌种,接入液体肉

第一作者:硕士研究生(张义正为通讯作者)。

收稿时间:2002-11-20

汁胨培养基中活化 24h ,按 10% 的接种量接入发酵培养基 ,28℃ ,180r/min 摇瓶发酵 72h。将发酵液离心 ,取上清液测酶活。

1.2.3 脂肪酶活力测定法

使用中国药典胰酶肠溶片的胰脂肪酶测定法<sup>[6]</sup> ,在 pH9.0 和 37℃ 的条件下每分钟水解脂肪生成 1μmol 游离脂肪酸的量定义为一个脂肪酶活力单位( U )。

2 结果与分析

2.1 菌种的筛选

表 1 菌株的生理生化特征

特 征	菌 株	枯草杆菌对照	特 征	菌 株	枯草杆菌对照
pH5.7 培养基生长	+	+	柠檬酸盐利用	+	+
过氧化氢酶	+	+	丙酸盐利用	+	+
还原 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> →NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	+	+	耐盐性		
V. P 反应	+	+	7% NaCl	+	+
V. P 反应中的 pH 值	6.7~7.0	6.0~6.4	10% NaCl	+	-
淀粉水解	+	+	碳源利用产酸		
酪素水解	+	+	乳 糖	+	-
明胶水解	+	+	木 糖	+	+
生长温度			果 糖	+	+
40℃	+	+	葡萄糖	+	+
50℃	-	+	甘露醇	+	+

2.2 产酶条件的优化

2.2.1 碳源对产酶的影响

以摇瓶培养基为基础 ,加入 1% 不同的碳源代替可溶性淀粉 ,37℃ 下摇瓶发酵 72h ,发酵液离心去除菌体沉淀测酶活 ,以 1% 可溶性淀粉为碳源时酶活为 100% ,结果见表 2。从表 2 可以看出 ,以可溶性淀粉为碳源最有利于产酶。

2.2.2 氮源对产酶的影响

以摇瓶培养基为基础 ,以 1% 可溶性淀粉为碳源 ,加入 2% 不同氮源 ,37℃ 下摇瓶发酵 72h ,将发酵液离心去除菌体沉淀测酶活 ,以 2% 黄豆粉和 2% 玉米粉的活力为 100% ,结果见表 2。从表 2 可以看出 ,黄豆粉和玉米粉为氮源最有利于产酶。

利用初筛培养基从 20 多个含油脂土样中筛选到 60 株油脂水解透明圈直径与菌落直径比值 > 3 的菌株 ,经平板划线法单菌落分离得到纯种 ,再摇瓶复筛确定一株产碱性脂肪酶活力较高的菌作为供试菌 ,菌落编号 E08。此菌的形态特征和培养特征 :菌落扁平 ,粘性 ,表面有褶皱 ,边缘呈裂叶状 ,革兰氏反应阳性 ,菌体短杆状 ,有芽孢 ,呈椭圆形 ,中生或近中生 ,芽孢囊不明显膨大 ,具运动性。经进一步通过生理生化试验( 见表 1 )。初步将此菌鉴定为解淀粉芽孢杆菌<sup>[7 8]</sup>。

表 2 碳源、氮源对产酶的影响

碳源种类	相对酶活	氮源种类	相对酶活
	/%		/%
可溶性淀粉	100	黄豆粉 + 玉米粉	100
橄榄油	82	黄豆粉	80
葡萄糖	76	黄豆粉 + 玉米浆	71
糊精	67	蛋白胨	69
甘露醇	60	酵母膏	64
蔗糖	58	硫酸铵	0
牛肉膏	53	硝酸铵	0
乳糖	46	硝酸钠	0

2.2.3 不同培养时间和温度对产酶的影响

表 3 培养时间及温度对产酶的影响  
( 酶活单位 :U/mL )

温度	培养时间/h				
/℃	36	48	60	72	96
25	2.5	3.4	5.0	6.5	4.6
30	3.2	4.4	6.3	8.0	5.1
37	3.8	4.9	5.5	6.9	4.2

以 1% 可溶性淀粉为碳源 ,以 2% 黄豆粉

和2%玉米粉为氮源,以摇瓶培养不同时间测酶活,结果如表3。由表3可知,菌体在30℃,72h时活力最高。

#### 2.2.4 不同起始 pH 对菌体产酶的影响

将发酵培养基用 NaOH 或 HCl 分别调至 pH5.0~10.0,在28℃下发酵72h,离心发酵液测活力,结果表明在 pH7.0 时活力最高(如图1)。

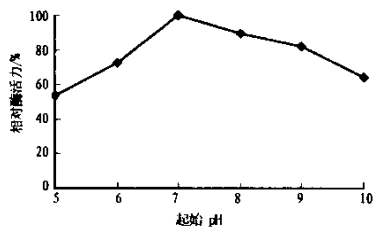


图1 起始 pH 对产酶的影响

#### 2.2.5 不同摇瓶装量与接种量对产酶的影响

在100mL三角瓶中分别装入不同量的培养基,调 pH8.5,以不同接种量接种,30℃摇瓶培养72h测酶活,结果分别见图2和图3。最适装量为15mL,最佳接种量为7%。

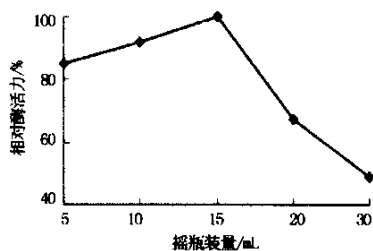


图2 摇瓶装量对产酶的影响

### 2.3 粗酶液性质的初步研究

#### 2.3.1 酶反应的最适温度

在 pH9.0 的条件下,取等量的发酵液在不同的温度下水浴保温10min,测其活力,结果如图4所示,该酶最适温度为37℃。

#### 2.3.2 酶作用的最适 pH 值

取等量的发酵液,以橄榄油为底物,在不同 pH 值下37℃水浴保温10min,测定酶活

力,结果如图5所示,该酶作用的最适反应 pH 8.5。

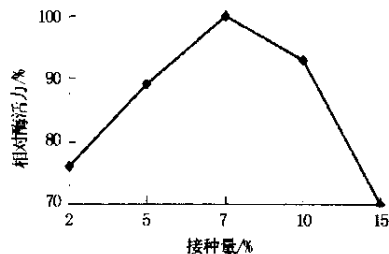


图3 接种量对产酶的影响

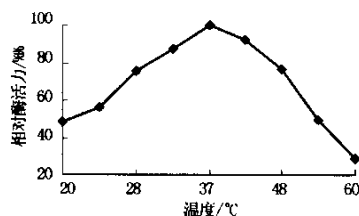


图4 温度与酶活力的关系

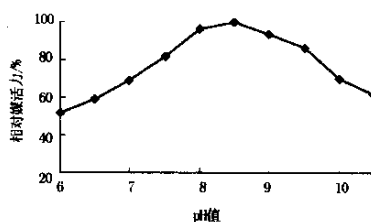


图5 pH 与酶活力的关系

#### 2.3.3 酶的热稳定性

取等量的发酵液分别置于30、40、50、60和70℃的水浴中保温30min,测其残留的酶活力,结果如图6。30、50℃保温30min后酶没有失活,60℃保温30min后只保留48%的活性,70℃保温30min酶活性几乎完全丧失,说明该酶具有一定的热稳定性。

#### 2.3.4 酶的 pH 稳定性

取等量的发酵液在不同的 pH 下,于37℃保温1h,测定其残留的酶活,结果如图7所示,该酶在 pH7.0~10.0 范围内活性稳定。

#### 2.3.5 金属离子对酶活的影响

考察了  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{K}^{+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Na}^{+}$  等对

酶活的影响,发现微量( $<0.01 \text{ mol/L}$ ) $\text{Ca}^{2+}$ 和 $\text{K}^{+}$ 有激活作用,量过多时与 $\text{Cu}^{2+}$ 和 $\text{Fe}^{3+}$ 一样,对该酶有抑制作用,其他金属离子影响不大。

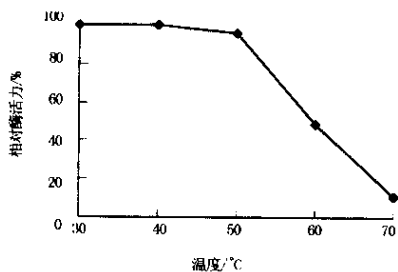


图 6 碱性脂肪酶的温度稳定性

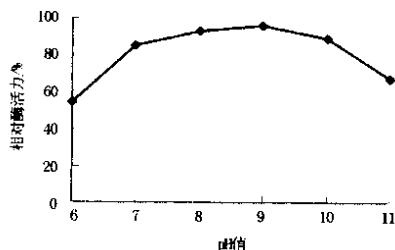


图 7 碱性脂肪酶的 pH 稳定性

### 3 结 论

在已报道的可产生脂肪酶的微生物中,野生型菌株的酶活都不高,而有关芽孢杆菌

属细菌产生脂肪酶的报道较少。我们从含油土样中筛选到一株产生碱性脂肪酶活性较高的野生型菌株,经初步鉴定为解淀粉芽孢杆菌,该菌以 1% 淀粉为碳源,2% 黄豆粉和 2% 玉米粉为氮源,起始 pH 7.0,100mL 三角瓶装量 15mL,30℃ 培养 72h 时产酶活力最高,可达 12U/mL,因此可作为出发菌株,供诱变、基因克隆<sup>[9]</sup>等研究之用。对发酵液中脂肪酶性质进行初步研究发现,脂肪酶在 37℃,pH 8.5 时酶活性最高。

### 参 考 文 献

- 1 施巧琴.微生物学通报,1981,8(3):108~110
- 2 高修功.微生物学报,1998,38(4):313~317
- 3 吴松刚,谢新东,黄建忠等.微生物学报,1997,37(1):32~39
- 4 于志森,谢衡.中国制革,1999,28(15):17~19
- 5 秦日方.无锡轻工大学学报,1998,17(1):22~26
- 6 中华人民共和国卫生部药典委员会.中华人民共和国药典(第二部).北京:化学工业出版社,1995.736~737
- 7 中国科学院微生物研究所细菌分类组.一般细菌常用鉴定方法.北京:科学出版社,1978
- 8 R.E.布坎南,N.E.杰本斯.伯杰细菌鉴定手册(第八版).北京:科学出版社,1984
- 9 Ihara F, Kageyama, Hirata M. J. Biol. Chem., 1991, 266(27):18 135~18 140

## Selection of an Alkaline Lipase-producing Strains and Optimalization of Its Fermentation Conditions

Niu Dongyun Zhang Yizheng

(College of Life Science, Sichuan University, Sichuan Key Lab of Molecular Biology & Biotechnology, Chengdu 610064)

**ABSTRACT** An alkaline lipase – producing bacterium strain was isolated from soil by means of solid plate method and was identified as *Bacillus. amyloliquefaciens*. Its optimal lipase – producing conditions were as follows: 1% soluble starch as carbon source, 2% soy bean meal and 2% corn meal as nitrogen source, initial pH7.0 and culture temperature 37℃ for 72h. The alkaline lipase activity is optimal at pH8.5 and 37℃, respectively, which was stimulated by  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^{+}$  but inhibited by  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$ .

**Key words** *Bacillus. amyloliquefaciens*, solid plate method, alkaline lipase, fermentation conditions, enzyme property